

**Entwicklung neuer Proteintransduktionssysteme
zur Hemmung des Transkriptionsfaktors NF- κ B**

DISSERTATION

der Fakultät für Chemie und Pharmazie
der Eberhard-Karls-Universität Tübingen

zur Erlangung des Grades eines Doktors
der Naturwissenschaften

2002

vorgelegt von

CHRISTOPHER STROH

Tag der mündlichen Prüfung: 23. September 2002

Dekan: Prof. Dr. H. Probst

1. Berichterstatter: Prof. Dr. K. W. Bock

2. Berichterstatter: Prof. Dr. K. Schulze-Osthoff

3. Berichterstatter: Prof. Dr. P. A. Baeuerle

Danksagung

Danksagen möchte ich:

Prof. Dr. Klaus Schulze-Osthoff für die Überlassung des Dissertationsthemas und die ständige Unterstützung und Diskussionsbereitschaft während meiner Doktorarbeit,

Prof. Dr. Karl Walter Bock für die Bereitschaft, die Arbeit vor der Fakultät für Chemie und Pharmazie zu vertreten,

Dr. Marek Los für seine stets große Hilfsbereitschaft bei Problemen jeglicher Art, Andree Zeipert für seine kompetente Hilfe bei den unzähligen bakteriellen Expressionen, Dr. Wolfgang Wybranietz für die Überlassung des Vektors pc49ep+2 und des anti-VP22 Antikörpers, Dr. Sebastian Wesselborg für fruchtbare Diskussionen und Anregungen,

Ajoy, Andrea, Andree, Ania, Christoph, Dagmar, Davide, Gosia, Gudrun, Ingo, Jörg, Kirsten, Manuela, Marek, Reiner, Sebastian und Ute für die gute Zusammenarbeit und Atmosphäre im Labor.

Herzlich möchte ich mich bei meiner Familie und Anika dafür bedanken, dass sie immer für mich da sind.

Inhaltsverzeichnis

Verwendete Abkürzungen.....	III
1. Einleitung.....	1
1.1 Der Transkriptionsfaktor NF- κ B	1
1.1.1 NF- κ B/Rel-Proteine	1
1.1.2 I κ B-Proteine	3
1.1.3 Allgemeiner Aktivierungsmechanismus von NF- κ B	5
1.1.4 Der I κ B-Kinasekomplex (IKK)	7
1.1.5 Modulation der NF- κ B-Aktivität und alternative Aktivierungswege	8
1.1.6 Physiologische Bedeutung von NF- κ B	9
1.1.7 Die Rolle von NF- κ B in pathologischen Prozessen	11
1.2 Proteintransduktion	13
1.3 Zielsetzung der Arbeit	17
2. Material und Methoden.....	18
2.1 Reagenzien, Antikörper und Enzyme	18
2.2 Klonierung bakterieller und eukaryontischer Expressionsvektoren	18
2.2.1 Hergestellte Konstrukte	18
2.2.2 PCR, Restriktion und Ligation	21
2.3 Transformation	22
2.3.1 Herstellung elektrokompenter Zellen	22
2.3.2 Elektroporation	22
2.4 Plasmidpräparation	22
2.4.1 Plasmidkontrolle durch Mini-Präparation	22
2.4.2 Maxi-Präparation	23
2.5 Expression und Aufreinigung rekombinanter Proteine in <i>E. coli</i>	23
2.6 Insektenzellkultur	26
2.7 Herstellung von rekombinanten Baculoviren	26
2.7.1 Transfektion und Virusgewinnung	26
2.7.2 Isolierung von reinen, rekombinanten Baculoviren	27
2.8 Baculovirale Expression und Aufreinigung von Proteinen	28
2.9 Zellkultur und Kryokonservierung eukaryontischer Zellen	30
2.10 Import von VP22-Fusionsproteinen	31

2.11 Import von I κ B α durch das Importpeptid Pep-1	31
2.12 Gewinnung von cytosolischen und Zellkernextrakten	31
2.13 Gewinnung von Ganz-Zellextrakten	32
2.14 Lysattest	32
2.15 EMSA (<i>electrophoretic mobility shift assay</i> , Gelshift)	32
2.16 Reporterstudien	33
2.17 Immunoblot (Western-Blot)	33
2.18 Indirekte Immunfluoreszenz	34
3. Ergebnisse.....	35
3.1 Expression von I κ B α und p65 Δ TAD als VP22-Fusionsproteine in eukaryontischen Zellen	35
3.2 Expression und Import von rekombinanten VP22-I κ B α -Fusionsproteinen	43
3.2.1 Expression von VP22-I κ B α in <i>E. coli</i>	43
3.2.2 Der Lysattest	57
3.2.3 Baculovirale Expression von VP22-I κ B α	60
3.3 Das Pep-1 System	70
4. Diskussion.....	75
4.1 Perspektiven der Proteintransduktionstechnologie zur Inhibition von NF- κ B durch I κ B α und p65 Δ TAD	75
4.1.1 Intrazelluläre Aufnahme von VP22-I κ B α -Fusionsproteinen	75
4.1.2 Export und Import von VP22-Fusionsproteinen sind unterschiedliche Prozesse	76
4.1.3 Strukturelle Aspekte der VP22-I κ B α -Fusionsproteine	77
4.1.4 Inhibition von NF- κ B durch VP22-I κ B α -Fusionsproteine	80
4.1.5 Perspektiven des VP22-Systems zur Inhibition von NF- κ B	81
4.1.6 Das Importpeptid Pep-1	83
4.1.7 Alternative Strategien zur Inhibition von NF- κ B	83
4.2 Allgemeine Perspektiven und Grenzen der Proteintransduktionstechnologie	85
5. Zusammenfassung.....	88
6. Literatur.....	91

Verwendete Abkürzungen

Amp	Ampicillin
ANTP	Antennapedia Homöoprotein
AS	Aminosäure(n)
ATP	Adenosintriphosphat
Bcl-3	<i>B cell lymphoma/leukemia-3</i>
bp	Basenpaar(e)
BSA	Rinderserumalbumin, <i>bovine serum albumin</i>
CD	Cytosin-Desaminase
CMV	Cytomegalie-Virus
COS-1 Zellen	Affennieren-Zellen mit stabiler Integration des kompletten SV-40 Genoms
COX-2	Cyclooxygenase-2
C-terminal	carboxyterminal
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxynukleosidtriphosphat
DTT	Dithiothreitol
ECL	<i>enhanced chemoluminescence</i>
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGTA	Ethylenglycol-bis-(2-aminoethylether)-tetraessigsäure
EMSA	<i>electrophoretic mobility shift assay</i>
FACS	<i>fluorescence activated cell sorting</i>
FCS	fötale Kälberserum, <i>fetal calf serum</i>
FGF	Fibroblasten-Wachstumsfaktor, <i>fibroblast growth factor</i>
GFP	Grün-fluoreszierendes Protein
GM-CSF	<i>granulocyte/macrophage-colony stimulating factor</i>
GSH	Glutathion
GST	Glutathion-S-Transferase
GTE	Glucose/Tris/EDTA
h	Stunde(n)
HeLa Zellen	humane Zelllinie aus einem zervikalen Adenokarzinom
HEPES	N-(2-Hydroxyethyl)-piperazin-N`-2-ethansulfonsäure
HIV-1	humanes Immundefizienz-Virus Typ-1
HPLC	<i>high performance liquid chromatography</i>
HSV-1	Herpes simplex-Virus Typ-1
ICAM-1	<i>intercellular adhesion molecule-1</i>

VERWENDETE ABKÜRZUNGEN

IgG	Immunglobulin G
IKK	IkappaB Kinasekomplex
IL	Interleukin
iNOS	induzierbare Nitroxid-Synthase
IPTG	Isopropylthiogalactosid
kD	Kilodalton
kV	Kilovolt
LB	Luria Broth
LPS	Lipopolysaccharid
LZ	Leucinzipper
MCF-7 Zellen	humane Zelllinie aus einem Mamma-Adenokarzinom
MCP-1	<i>monocyte chemoattractant protein-1</i>
MEKK	<i>mitogen-activated protein kinase/ERK kinase kinase</i>
min	Minute(n)
ml	Milliliter
MOI	<i>multiplicity of infection</i>
ms	Millisekunde(n)
MW	Molekulargewicht
NAK	NF- κ B-aktivierende Kinase
NCS	<i>newborn calf serum</i>
NEMO	NF- κ B <i>essential modulator</i>
NES	<i>nuclear export signal</i> , Kernexport-Signal
NF- κ B	<i>nuclear factor kappaB</i>
NIK	NF- κ B-induzierende Kinase
Ni-NTA	Nickel-Nitrilotriacetat
NLS	<i>nuclear localization signal</i> , Kernlokalisations-Signal
NP-40	Nonidet P-40, Nonylphenoxypolyethoxyethanol
N-terminal	aminoterminal
OD	optische Dichte
PBS	Phosphat gepufferte Kochsalzlösung, <i>phosphate buffered saline</i>
PCR	Polymerase-Kettenreaktion, <i>polymerase chain reaction</i>
pfu	<i>plaque forming units</i>
PKB	Proteinkinase B
PKC	Proteinkinase C
Pen	Penicillin
PMA	Phorbolmyristylacetat
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
PNK	Polynukleotid-Kinase
PTD	Proteintransduktions-Domäne

Rel	<i>Retikuloendotheliosis</i>
RHD	Rel-Homologiedomäne
RLU	<i>relative light units</i>
RNA	Ribonukleinsäure
rpm	Umdrehungen pro Minute, <i>rounds per minute</i>
RT	Raumtemperatur
SAP	<i>shrimp alkaline phosphatase</i>
SCF	Skp1-Cullin-F-Box
SDS	Natriumdodecylsulfat, <i>sodium dodecyl sulfate</i>
SDS-PAGE	SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese
sek	Sekunde(n)
Sf	<i>Spodoptera frugiperda</i>
SH2-Domäne	Src-homologe Domäne 2
STE	Natriumchlorid (<i>sodium</i>)/Tris/EDTA
Strep	Streptomycin
SV-40	Simian Virus 40
Taq	<i>Thermus aquaticus</i>
TBE	Tris/Borsäure/EDTA
TD	Transaktivierungsdomäne
TE	Tris/EDTA
TNF α	Tumornekrose-Faktor α
TK	Thymidin-Kinase
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
Triton X-100	t-Octylphenoxypolyethoxyethanol
U	unit
UV	ultraviolettes Licht
V	Volt
VCAM-1	<i>vascular cell adhesion molecule-1</i>
X-Gal	5-Brom-4-chlor-3-indoxyl- β -D-galactosid
293 Zellen	humane embryonale Nierenzelllinie transformiert mit gescherter DNA von humanem Adenovirus, Serotyp 5

1 Einleitung

1.1 Der Transkriptionsfaktor NF- κ B

Der Transkriptionsfaktor NF- κ B wurde 1986 in B-Zellen als ein Protein mit hoher konstitutiver Aktivität entdeckt, das an ein spezifisches Sequenzmotiv (κ B) im Enhancer der Gene für die leichte Kette κ der Immunglobuline bindet (Sen und Baltimore, 1986). NF- κ B wird im Organismus ubiquitär exprimiert und ist konserviert von *Drosophila* bis zum Menschen. In den meisten Zellen und Geweben wird NF- κ B im Cytoplasma durch Wechselwirkung mit inhibitorischen I κ B-Proteinen in einem inaktiven Zustand gehalten.

Der Transkriptionsfaktor spielt eine wichtige Rolle im Immunsystem und bei inflammatorischen Reaktionen. Darüber hinaus ist NF- κ B an einer Reihe von zellulären Prozessen beteiligt, wie Zelladhäsion, Wachstumskontrolle, Differenzierung und Apoptose (zusammengefasst in Verma *et al.*, 1995; Baldwin, 1996; Karin und Ben-Neriah, 2000). Da eine Vielzahl der unterschiedlichsten Zellstress induzierenden Substanzen zur Aktivierung des Transkriptionsfaktors führt, wird NF- κ B als ein zentraler Regulator der Stressantwort gesehen (Mercurio und Manning, 1999; Pahl, 1999). Eine Fehlregulation des NF- κ B-Signalweges korreliert mit schwerwiegenden Erkrankungen wie chronischen Entzündungen und Krebs (zusammengefasst in Aradhya und Nelson, 2001; Yamamoto und Gaynor, 2001).

1.1.1 NF- κ B/Rel-Proteine

NF- κ B ist ein dimerer Transkriptionsfaktor, dessen Untereinheiten aus Proteinen der Rel-Familie bestehen. In Säugetieren sind fünf NF- κ B/Rel-Proteine bekannt: p50/NF- κ B1 (p105), p52/NF- κ B2 (p100), p65 (RelA), RelB und c-Rel. Sie besitzen eine 300 Aminosäuren umfassende konservierte Rel-Homologiedomäne (RHD), die eine Sequenzhomologie zu v-Rel, dem transformierenden Protein des Retikuloendotheliosis-Virus, aufweist (Stephens *et al.*, 1983). Die Rel-Homologiedomäne ist verantwortlich für die Dimerisierung, die DNA-Bindung, die Wechselwirkung mit I κ B-Proteinen und die Kernlokalisierung. Nur p65, RelB und c-Rel haben in ihrem C-terminalen Teil Transaktivierungsdomänen. P50 und p52 werden aus den Vorläuferproteinen p105 und p100 gebildet. Beide Vorläuferproteine enthalten in ihrer C-terminalen Hälfte sieben Ankyrin-Wiederholungen. Diese etwa 30 Aminosäuren umfassenden Motive maskieren die Kernlokalisationssequenz der RHD und bewirken eine Zurückhaltung der Proteine im Cytoplasma. Nach proteolytischer Abspaltung der Ankyrin-Wiederholungen durch das 26S-Proteasom entstehen p50 und p52 (Palombella *et al.*, 1994; zusammengefasst in Baldwin, 1996; Karin und Ben-Neriah, 2000).

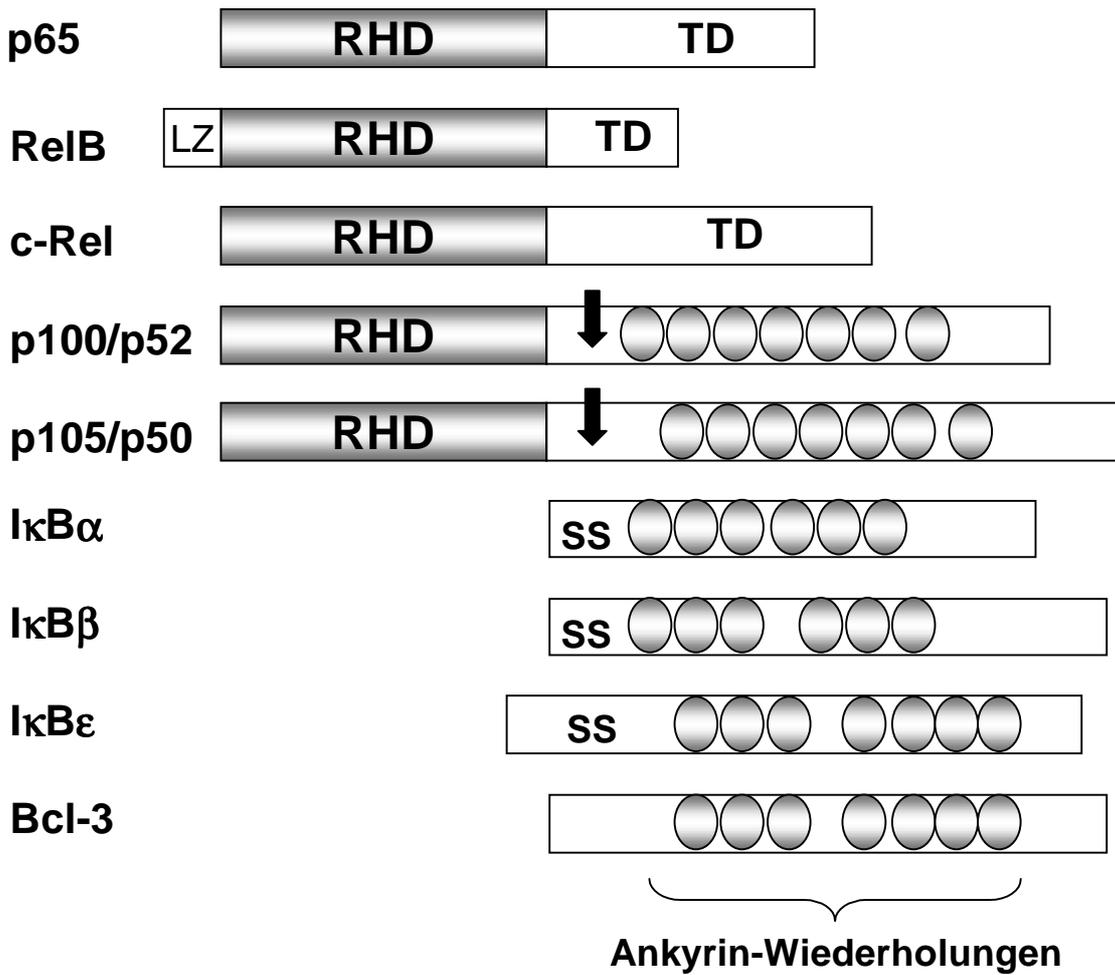


Abbildung 1: NF-κB/Rel- und IκB-Proteine (verändert nach Karin und Ben-Neriah, 2000). LZ: Leucin-Zipper, RHD: Rel-Homologiedomäne, TD: Transaktivierungsdomäne, SS: SS steht für die beiden Serine in der N-terminalen Region von IκBα, IκBβ und IκBε, die durch den IκB-Kinasekomplex (IKK) phosphoryliert werden (vgl. 1.1.3 und Abb. 2). P50 und p52 entstehen aus ihren Vorläuferproteinen p105 und p100 durch limitierte Proteolyse durch das 26S-Proteasom. Die Schnittstellen sind schematisch durch einen schwarzen Pfeil markiert. Nicht dargestellt ist IκBγ, das der C-terminalen Domäne von p105 entspricht.

Die NF-κB/Rel-Proteine können eine Reihe verschiedener Homo- und Heterodimer-Kombinationen ausbilden, die eine unterschiedliche Bindungsaffinität zu den NF-κB-Erkennungsmotiven (κB-Stellen) in den Promotoren der von NF-κB regulierten Gene aufweisen. Die κB-Stellen haben die Konsensussequenz GGGRNNYYCC, wobei R für ein Purin, Y für ein Pyrimidin und N für eine beliebige Base steht. Da p50- und p52-Homodimere keine Transaktivierungsdomäne besitzen, wirken diese Dimer-Kombinationen entweder als Transkriptionsrepressoren oder müssen andere, transaktivierende Bindungspartner rekrutieren (Chen und Ghosh, 1999; Karin und Ben-Neriah, 2000). Die Röntgenstrukturanalyse verschiedener an DNA gebundener NF-κB-Dimere hat aufgedeckt, dass die beiden Untereinheiten die DNA in der Form von Schmetterlingsflügeln umschließen. Jede

Untereinheit ist in zwei Immunglobulin-ähnliche Domänen gefaltet, von denen die N-terminale für die spezifische DNA-Bindung verantwortlich ist, während die C-terminale hauptsächlich die Dimerisierung bewirkt (Ghosh *et al.*, 1995; Müller *et al.*, 1995; Chen, F. E. *et al.*, 1998; Chen, Y. Q. *et al.*, 1998). Die NF- κ B/Rel-Proteine variieren nicht nur in ihrer DNA-Bindungsaffinität, je nachdem welches Dimer vorliegt, sondern sie werden in verschiedenen Geweben auch unterschiedlich exprimiert. Dies ermöglicht eine differenzierte zell- und gewebsspezifische Regulation der NF- κ B responsiven Gene. Die am weitesten verbreitete und am häufigsten gefundene Kombination ist das p50/p65-Heterodimer (zusammengefasst in Baldwin 1996; Chen und Ghosh, 1999; Karin und Ben-Neriah, 2000). Weitere Komplexität erfährt die Regulation der NF- κ B-Aktivität durch die Wechselwirkung des Transkriptionsfaktors mit I κ B-Proteinen.

1.1.2 I κ B-Proteine

Zur I κ B-Familie in Säugetieren gehören I κ B α , I κ B β , I κ B γ , I κ B ϵ , Bcl-3 sowie die Vorläuferproteine von p50 und p52, p105 und p100. Sie zeichnen sich durch den Besitz von sechs oder sieben Ankyrin-Wiederholungen aus. I κ B-Proteine binden im Cytoplasma an NF- κ B, wodurch die Kernlokalisationssequenz der Rel-Proteine verdeckt wird und der Transkriptionsfaktor in einem inaktiven Zustand gehalten wird. Für die Inhibition von NF- κ B sind hauptsächlich I κ B α , I κ B β und I κ B ϵ von Bedeutung, die mit dem NF- κ B-Dimer unter Ausbildung eines ternären Komplexes wechselwirken. Sie haben eine N-terminale Domäne, über die der Abbau der I κ B-Proteine nach NF- κ B aktivierenden Stimuli durch das 26S-Proteasom reguliert wird. Dies hat die Freisetzung, die Translokation in den Zellkern und somit die Aktivierung von NF- κ B zur Folge (zusammengefasst in Baldwin, 1996; Karin und Ben-Neriah, 2000).

I κ B α ist das am längsten bekannte und das am besten charakterisierte I κ B-Protein (Ghosh und Baltimore, 1990; Zabel und Baeuerle, 1990; Davis *et al.*, 1991; Haskill *et al.*, 1991). Es ist ein 38 kD großes Protein mit einem hohen Anteil an sauren Aminosäureresten (Aspartat und Glutamat). Es besteht aus einer 70 Aminosäuren umfassenden N-terminalen regulatorischen Domäne, einer langen zentralen Domäne, die sechs Ankyrin-Wiederholungen beherbergt, und einer kurzen C-terminalen Domäne mit einer PEST-Region. I κ B α wird ubiquitär im Organismus exprimiert und bindet vorzugsweise an Dimere, die p65 oder c-Rel enthalten (Baldwin, 1996; Ghosh *et al.*, 1998). Es existieren zwei in Details voneinander abweichende Röntgenstrukturanalysen von I κ B α im Komplex mit einem p50/p65-Heterodimer (Huxford *et al.*, 1998; Jacobs und Harrison, 1998). Beide zeigen jedoch, dass I κ B α mit seinen Ankyrin-Wiederholungen und seiner PEST-Region ausgedehnte Kontakte zu den RHDs von p50 und vor allem p65 ausbildet, was die hohe Bindungsaffinität von I κ B α zu NF- κ B erklärt. Alle bekannten NF- κ B aktivierenden Signale führen zu einem sehr schnellen Abbau von I κ B α . NF- κ B fördert seinerseits effektiv die Resynthese von I κ B α (Sun *et al.*,

1993), das in den Zellkern transportiert wird, wo es aufgrund seiner hohen Affinität zu NF- κ B den Transkriptionsfaktor von der DNA entfernen kann (Arenzana-Seisdedos *et al.*, 1995). Der neu gebildete I κ B α /NF- κ B-Komplex gelangt zurück in das Cytoplasma. Durch diesen Rückkopplungsmechanismus führen fast alle NF- κ B-aktivierenden Signale zu einer nur transienten Aktivierung von NF- κ B. Der Kernimport des neu synthetisierten I κ B α und der Rücktransport des I κ B α /NF- κ B-Komplexes aus dem Kern werden durch die Kernimportsequenz (NLS, „*nuclear localization signal*“) und die Kernexportsequenz (NES, „*nuclear export sequence*“), die beide in den Ankyrin-Wiederholungen von I κ B α liegen, vermittelt (Sachdev *et al.*, 1998; Johnson *et al.*, 1999). Im Gegensatz zu I κ B β und I κ B ϵ können NF- κ B-Komplexe mit I κ B α auch in den Kern importiert werden (Tam und Sen, 2000). Der Import kommt dadurch zustande, dass I κ B α im Gegensatz zu I κ B β nur eine der beiden NLS des NF- κ B Dimers blockiert (Malek *et al.*, 2001). Die Lokalisation von I κ B α /NF- κ B-Komplexen ist somit ein dynamischer Prozess, der einen effektiven Kernexport erfordert.

I κ B β wurde 1995 kloniert (Thompson *et al.*, 1995) und hat wie I κ B α eine N-terminale regulatorische Domäne, eine zentrale Domäne mit sechs Ankyrin-Wiederholungen und eine C-terminale Domäne mit einer PEST-Region. Desgleichen wird I κ B β weitverbreitet exprimiert und zeigt eine Präferenz zur Bindung an NF- κ B-Dimere, die p65 und c-Rel enthalten (Baldwin, 1996; Ghosh *et al.*, 1998). Im Gegensatz zu I κ B α wird I κ B β jedoch nur nach Stimulation mit LPS und IL-1 abgebaut, die beide eine persistente Aktivierung von NF- κ B hervorrufen (Suyang *et al.*, 1996). I κ B β wird nicht durch NF- κ B reguliert, so dass kein dem I κ B α -System entsprechender negativer Rückkopplungsmechanismus besteht. Weiterhin wurde gezeigt, dass I κ B β ein geringeres Potential als I κ B α besitzt, die Bindung von NF- κ B an DNA zu inhibieren (Tran *et al.*, 1997). Die PEST-Region von I κ B β scheint dafür verantwortlich zu sein, dass die Aktivierung von NF- κ B nach LPS und IL-1 Stimulation noch andauert, wenn der ursprünglich degradierte I κ B α -Pool schon längst wieder sein Ausgangsniveau erreicht hat. In unstimulierten Zellen weist I κ B β eine basale Phosphorylierung in seiner PEST-Region auf. LPS und IL-1 bewirken die Akkumulation von unphosphoryliertem I κ B β im Zellkern, wo es an NF- κ B bindet, ohne den Transkriptionsfaktor von der DNA zu entfernen. Auf diese Weise wird die Bindung von I κ B α an NF- κ B blockiert und die Transkription der entsprechenden Gene hält an (Suyang *et al.*, 1996; McKinsey *et al.*, 1997). Cytoplasmatische I κ B β /NF- κ B-Komplexe können nicht in den Zellkern gelangen, da I κ B β beide NLS des NF- κ B-Dimers maskiert (Malek *et al.*, 2001; Tam und Sen, 2001).

I κ B ϵ ist das zuletzt entdeckte und charakterisierte I κ B-Familienmitglied (Li und Nabel, 1997; Simeonidis *et al.*, 1997; Whiteside *et al.*, 1997). Es besteht eine große strukturelle Ähnlichkeit zu I κ B α und I κ B β , allerdings besitzt I κ B ϵ keine PEST-Region in seiner C-terminalen Domäne. Es ist ausschließlich cytoplasmatisch lokalisiert und bindet bevorzugt an p65- oder c-Rel-Homodimere und p65/c-Rel-Heterodimere. Wie auch I κ B β wird I κ B ϵ im Vergleich zu

I κ B α nach NF- κ B aktivierenden Stimuli mit langsamerer Kinetik abgebaut und unterliegt keiner Regulation durch NF- κ B. I κ B ϵ weist eine hohe Expression in Makrophagen auf.

P105 und p100 sind „Zwitter“: Ihre N-terminale Hälfte entspricht den Rel-Proteinen p50 und p52, die aus ihren Vorläuferproteinen durch limitierte Proteolyse durch das 26S-Proteasom entstehen, ihre C-terminale Hälfte mit sieben Ankyrin-Wiederholungen macht sie jedoch zu Mitgliedern der I κ B-Familie. Sie binden an ein NF- κ B/Rel-Protein unter Ausbildung eines Dimers, wobei keine Präferenz für ein bestimmtes Rel-Protein zu bestehen scheint. NF- κ B aktivierende Stimuli führen zum Abbau der C-terminalen Hälfte und zur Freisetzung eines NF- κ B-Dimers, das aus p50 bzw. p52 und einem weiteren Rel-Protein zusammengesetzt ist (Baldwin, 1996). P100 ist vor allem für die Regulation von RelB von Bedeutung (Solan *et al.*, 2002). I κ B γ ist identisch mit den 607 C-terminalen Aminosäureresten von p105 und entsteht durch einen alternativen Start der Transkription des NF- κ B1-Gens von einem internen intronischen Promotor aus (Inoue *et al.*, 1992). I κ B γ inhibiert p50- und p52-Homodimere und scheint auf murine B-Zellen beschränkt zu sein (Baldwin, 1996).

Bcl-3 wurde als Onkogen in leukämischen B-Zellen gefunden (Ohno *et al.*, 1990). Es weist eine hohe Expression in den Lymphknoten und in der Milz auf und ist im Gegensatz zu den anderen I κ B-Proteinen im Zellkern lokalisiert. Dort bindet es an p50- oder p52-Homodimere, die es von der DNA entfernt und so die Bindung von NF- κ B-Dimeren mit Transaktivierungsdomänen ermöglicht (Franzoso *et al.*, 1993). Die gebildeten ternären Komplexe können aber auch direkt, ohne die DNA zu verlassen, die Transkription aktivieren (Bours *et al.*, 1993). Somit ist Bcl-3 eher ein NF- κ B-Aktivator als ein Inhibitor.

1.1.3 Allgemeiner Aktivierungsmechanismus von NF- κ B

Eine Vielzahl der unterschiedlichsten Stimuli führt zur Aktivierung von NF- κ B. Darunter fallen Cytokine wie TNF α und IL-1, Wachstumsfaktoren, Hormone, LPS, Viren, virale Produkte, oxidativer Stress, Chemotherapeutika und Phorbolster (für eine umfassende Übersicht siehe Pahl, 1999). Mit wenigen Ausnahmen (s. 1.1.5) konvergieren alle NF- κ B aktivierenden Signalwege beim I κ B-Kinasekomplex (IKK). Dieser phosphoryliert die I κ B-Proteine an spezifischen Serinresten, was als Signal für eine nachfolgende Polyubiquitinierung und den anschließenden Abbau der I κ B-Proteine durch das 26S-Proteasom dient. Das dadurch freigesetzte NF- κ B transloziert in den Zellkern, wo es an die κ B-Motive in den Promotoren seiner Zielgene bindet (Abb. 2; zusammengefasst in Baldwin, 1996; Karin und Ben-Neriah, 2000). Der Mechanismus ist am besten charakterisiert für I κ B α . Der IKK-Komplex phosphoryliert I κ B α an den Serinresten 32 und 36 in der N-terminalen, regulatorischen Domäne (Brown *et al.*, 1995). Die Phosphorylierung dient als Erkennungsmotiv für den SCF/ β -TrCP Ubiquitin-Ligase-Komplex (Yaron *et al.*, 1998), was die Polyubiquitinierung der Lysinreste 21 und 22 zur Folge hat (Scherer *et al.*, 1995). Polyubiquitiniertes I κ B α wird durch das 26S-Proteasom abgebaut. Über den gleichen Weg

erfolgt die Aktivierung von NF- κ B in Komplexen mit I κ B β und I κ B ϵ , die entsprechende Serin- und Lysinreste in ihrer N-terminalen Domäne besitzen (zusammengefasst in May und Ghosh, 1998). Ebenso wurde gezeigt, dass die Prozessierung von p105 über die Phosphorylierung der Serinreste 923 und 927 durch den IKK-Komplex, die Ubiquitinierung der Lysinreste 441 und 442 durch SCF/ β -TrCP und die anschließende Proteolyse durch das 26S-Proteasom verläuft (Orian *et al.*, 2000; Heissmeyer *et al.*, 2001; Salmeron *et al.* 2001).

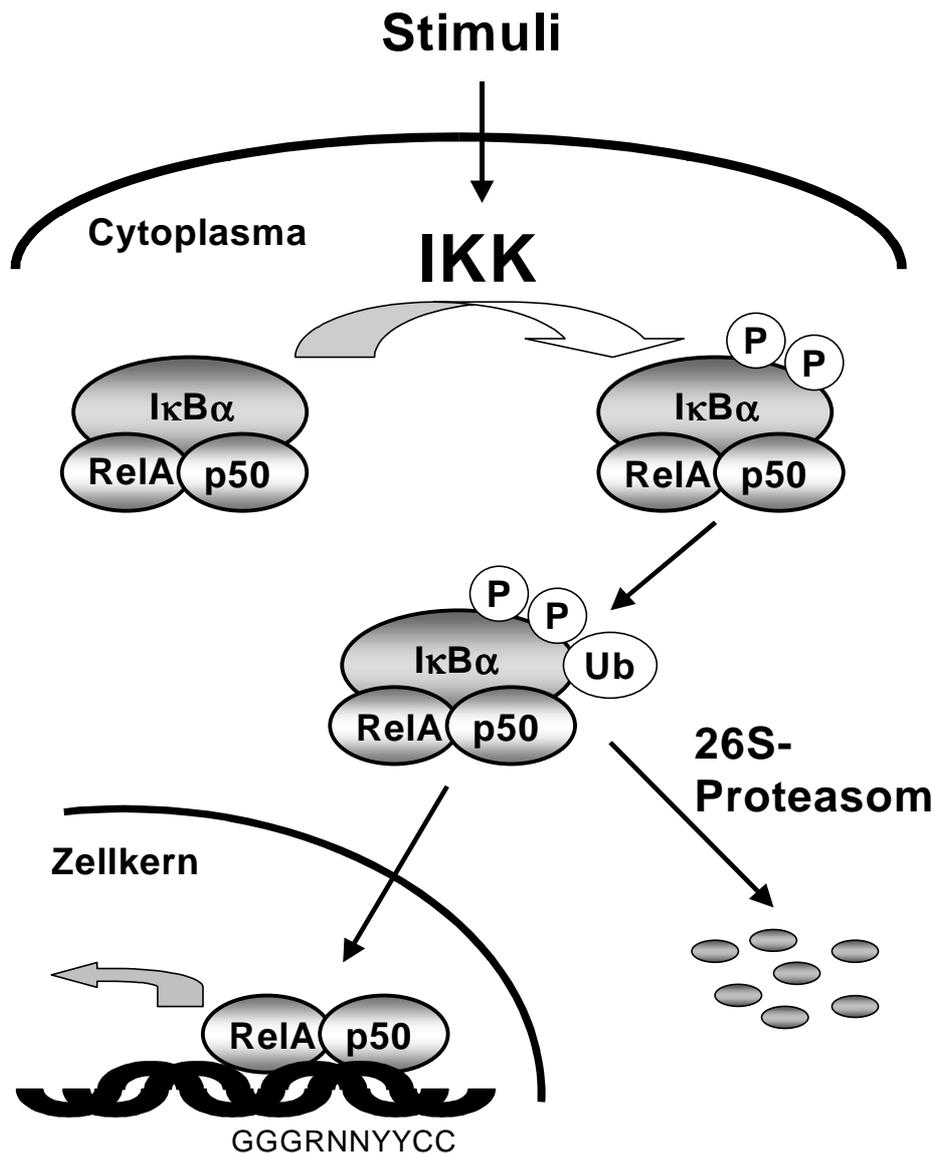


Abbildung 2: Allgemeiner Aktivierungsmechanismus von NF- κ B. Beispielhaft ist die Aktivierung eines p65(RelA)/p50-Heterodimers in Komplex mit I κ B α dargestellt. Fast alle NF- κ B aktivierenden Stimuli aktivieren den I κ B-Kinasekomplex (IKK). Dieser phosphoryliert I κ B α an den Serinresten 32 und 36, was als Signal für eine nachfolgende Polyubiquitinierung von I κ B α durch die SCF/ β -TrCP Ubiquitin-Ligase an den Lysinresten 21 und 22 dient. Polyubiquitiniertes I κ B α wird durch das 26S-Proteasom degradiert und das freigesetzte NF- κ B transloziert in den Zellkern, wo es an das κ B-Erkennungsmotiv in den Promotoren seiner Zielgene bindet und diese reguliert. κ B-Konsensussequenz: GGGRNNYYCC (R: Purin-, Y: Pyrimidin-, N: beliebige Base).

1.1.4 Der I κ B-Kinasekomplex (IKK)

Der I κ B-Kinasekomplex (IKK) hat ein Molekulargewicht von etwa 900 kD und bereits bei seiner Entdeckung konnten zwei seiner Bestandteile identifiziert werden: Die Serin-/Threonin-Kinasen IKK α und IKK β (DiDonato *et al.*, 1997; Mercurio *et al.*, 1997; Regnier *et al.*, 1997; Zandi *et al.*, 1997). IKK α und IKK β haben ein Molekulargewicht von 85 bzw. 87 kD und weisen eine große Sequenzhomologie auf. Sie besitzen eine N-terminale Kinasedomäne sowie ein Leucizipper (LZ)- und ein Helix-Loop-Helix (HLH)-Motiv in ihrem C-terminalen Teil. IKK α und IKK β sind die Hauptbestandteile des IKK-Komplexes und die Mehrheit der IKK-Komplexe enthält etwa äquimolare Mengen der Kinasen (Rothwarf *et al.*, 1998; Karin und Ben-Neriah, 2000). In Experimenten mit rekombinantem IKK α und IKK β konnte gezeigt werden, dass beide Kinasen verschiedene I κ B-Substrate effizient und korrekt phosphorylieren (Zandi *et al.*, 1998). Überraschend war daher die Beobachtung, dass nur IKK β für die induzierbare Aktivierung von NF- κ B wichtig zu sein scheint. IKK β *knock-out* Mäuse sterben embryonal durch massive Leberdegeneration. In Zellen dieser Mäuse lässt sich NF- κ B nicht mehr aktivieren und das intakte IKK α -Gen ist offenbar nicht in der Lage, den Ausfall von IKK β zu kompensieren (Li, Q. *et al.*, 1999; Li, Z. *et al.* 1999; Tanaka *et al.*, 1999). Demgegenüber weisen Zellen von IKK α defizienten Mäusen eine intakte, wenn auch teilweise verminderte Aktivierung von NF- κ B auf. Die Mäuse sterben kurz nach der Geburt und haben eine undifferenzierte, extrem verdickte Epidermis, die das Auswachsen der Extremitäten verhindert (Hu *et al.*, 1999; Takeda *et al.*, 1999). IKK α spielt eine zentrale Rolle in der Differenzierung der Keratinocyten, wobei IKK α seine Funktion in diesem Prozess nicht über die Aktivierung von NF- κ B vermittelt (Hu *et al.*, 2001). Es wurde jedoch festgestellt, dass IKK α in B-Zellen für die Reifung, die erhöhte Expression bestimmter NF- κ B-Zielgene und vor allem für die Prozessierung von p100 zu p52 erforderlich ist (Senftleben *et al.*, 2001).

Als dritte Komponente des IKK-Komplexes wurde IKK γ gefunden, ein 48 kD großes Protein ohne katalytische Aktivität (Rothwarf *et al.*, 1998; Yamaoka *et al.*, 1998). Die *knock-out* Mäuse von IKK β und IKK γ weisen einen sehr ähnlichen Phänotyp auf, und wie IKK β ist IKK γ absolut erforderlich für die induzierbare Aktivierung von NF- κ B (Rudolph *et al.*, 2000). Die Funktion von IKK γ wird in der Koordination der Zusammenlagerung des IKK-Komplexes und der Rekrutierung von I κ B-Proteinen oder Proteinen, die die Aktivität von IKK modulieren, vermutet (Karin, 1999; Poyet *et al.*, 2000; Li *et al.*, 2001; Yamamoto *et al.* 2001).

Die genaue Stöchiometrie des IKK-Komplexes ist bisher nicht bekannt. Auch die Beteiligung anderer Komponenten konnte nicht zweifelsfrei nachgewiesen werden. Als Baueinheit werden zwei Heterodimere von IKK α und IKK β vermutet, die von einem IKK γ -Dimer oder Trimer zusammengehalten werden. Die Wechselwirkung zwischen IKK α und IKK β wird über ihre Leucizippertomotive vermittelt (Karin, 1999; Karin und Ben-Neriah, 2000).

Wie die I κ B-Proteine so wird auch IKK durch Phosphorylierung reguliert (Delhase *et al.*, 1999). Durch NF- κ B aktivierende Stimuli werden in den Kinasedomänen spezifisch die Serinreste 176 und 180 von IKK α und 177 und 181 von IKK β phosphoryliert. Dadurch wird der IKK-Komplex aktiviert, wobei nur die Phosphorylierung von IKK β für die Aktivierung notwendig ist. Es wird angenommen, dass eine IKK-Kinase die initiale Phosphorylierung übernimmt und die vollständige Aktivierung von IKK dann über Trans-Autophosphorylierung verläuft. Der aktivierte IKK-Komplex phosphoryliert nun einerseits I κ B-Proteine, gleichzeitig findet aber auch eine extensive Autophosphorylierung im C-terminalen Bereich von IKK α und IKK β statt. Dadurch kommt es wahrscheinlich zu einer Konformationsänderung, wodurch IKK von einem Zustand mit hoher Aktivität in einen mit geringer Aktivität übergeht (Delhase *et al.*, 1999). Zusätzlich wird diskutiert, dass Phosphatasen an der Inaktivierung beteiligt sind, indem sie die betroffenen Serinreste in den Kinasedomänen dephosphorylieren (Karin, 1999; Karin und Ben-Neriah, 2000). Somit wird die Aktivität von NF- κ B auch auf der Ebene des IKK-Komplexes genau reguliert und über diese negative Rückkopplung wird verhindert, dass Stimuli zu einer dauerhaften Aktivierung des Transkriptionsfaktors führen, was für den Organismus negative Folgen haben könnte (s. 1.1.7).

Da die Aktivierung von NF- κ B durch die unterschiedlichsten Stimuli über den IKK-Komplex verläuft, ist es nicht verwunderlich, dass eine ganze Reihe von Kinasen gefunden wurde, die potentielle Kandidaten für die initiale Phosphorylierung von IKK sind. Zu ihnen gehören PKC, NIK, AKT/PKB, MEKK1-3, COT/TPL-2 (zusammengefasst in Karin und Ben-Neriah, 2000), sowie NAK (Tojima *et al.*, 2000) und die Ubiquitin abhängige Kinase TAK1 (Wang *et al.*, 2001).

Ein weiterer IKK-Komplex, der weder IKK α , IKK β noch IKK γ enthält, wurde in T-Zellen und Makrophagen gefunden (Shimada *et al.*, 1999; Peters *et al.*, 2000). Die aus ihm isolierte Kinase, IKK ϵ oder IKK i , weist 27% Homologie zu IKK α und IKK β auf und phosphoryliert I κ B α nach PMA-Stimulation und T-Zellrezeptor-Aktivierung. Keinen Einfluss hat IKK ϵ auf die NF- κ B-Aktivierung nach TNF α - oder IL-1-Behandlung (Peters *et al.*, 2000). Die genaue Rolle dieses neuen IKK-Komplexes muss noch untersucht werden. Dass für eine Vielzahl von getesteten Stimuli das Vorhandensein von IKK β und IKK γ absolute Voraussetzung für die Aktivierung von NF- κ B ist, zeigt - wie auch der fatale Phänotyp von IKK β und $-\gamma$ defizienten Mäusen - die zentrale Bedeutung des „klassischen“ IKK. Es kann natürlich nicht ausgeschlossen werden, dass andere IKK-Komplexe in bestimmten Organen und Geweben wichtig sind für eine spezifische Regulation und Modulation der NF- κ B-Aktivität.

1.1.5 Modulation der NF- κ B-Aktivität und alternative Aktivierungswege

Neben der Regulation durch I κ B-Proteine ist NF- κ B auch selbst Ziel posttranslationaler Modifikationen, die seine Aktivität modulieren. So findet nach PMA-Stimulation eine Hyperphosphorylierung von p50 an Serinresten statt, die Voraussetzung für die

Kerntranslokation des Rel-Proteins ist. Phosphoryliertes p50 weist weiterhin eine erhöhte DNA-Bindungsaffinität auf (Li *et al.*, 1994). Auch von p65 weiß man, dass Phosphorylierung des Serinrestes 276 durch die PKA seine Bindung an κ B-Motive und die transkriptionelle Aktivität verstärkt (Zhong *et al.*, 1998). Die Aktivierung von NF- κ B stellt sich somit als ein komplexer, fein regulierter Prozess dar, der 1. von der Expression der verschiedenen Rel-Proteine und ihrer Dimerbildung, 2. von der Wechselwirkung mit den verschiedenen I κ B-Proteinen mit ihren speziellen Eigenschaften, 3. von der Regulation des IKK-Komplexes und 4. von der posttranslationalen Modifikation der Rel-Proteine beeinflusst wird.

Auch wenn fast alle der über 300 bekannten NF- κ B aktivierenden Stimuli eine Phosphorylierung von I κ B durch IKK bewirken, so gibt es doch wenige Ausnahmen, die zur Aktivierung des Transkriptionsfaktors über alternative Wege führen: UV-Strahlung aktiviert NF- κ B über einen Abbau von I κ B α durch das 26S-Proteasom, ohne dass I κ B α phosphoryliert wird (Bender *et al.*, 1998; Li und Karin, 1998). Der Mechanismus konnte bisher nicht geklärt werden. Hypoxie oder Pervanadat-Behandlung resultieren in Phosphorylierung des Tyrosinrestes 42 von I κ B α (Imbert *et al.*, 1996). I κ B α wird daraufhin nicht degradiert, sondern wechselwirkt wahrscheinlich mit der SH2-Domäne der Phosphoinositol-3 (PI3)-Kinase, was zur Dissoziation des I κ B α /NF- κ B-Komplexes führt (Beraud *et al.*, 1999). Der Tyrosinrest in Position 42 ist in den anderen I κ B-Proteinen nicht konserviert, so dass dieser Mechanismus auf I κ B α beschränkt ist.

1.1.6 Physiologische Bedeutung von NF- κ B

Man kennt inzwischen annähernd 200 Gene, die durch NF- κ B reguliert werden (für eine umfassende Auflistung siehe Pahl, 1999). Ein großer Teil dieser Gene kodiert Cytokine, Chemokine, Immunrezeptoren, Proteine, die an der Antigenpräsentation beteiligt sind, Zelladhäsions-Proteine, Akute-Phase-Proteine und Proteine der Stressantwort. Dies zeigt die herausragende Bedeutung des Transkriptionsfaktors im Immunsystem und bei inflammatorischen Reaktionen (zusammengefasst in Ghosh *et al.*, 1998). Außerdem finden sich unter den NF- κ B-Zielgenen Apoptose und Zellzyklus regulierende Gene, Wachstumsfaktoren, Transkriptionsfaktoren sowie eine beträchtliche Anzahl weiterer Gene. So spielt NF- κ B ebenfalls eine wichtige Rolle in Differenzierungsprozessen, der Zellzyklusprogression und der Apoptose (zusammengefasst in Baldwin, 1996; Aggarwal, 2000; Chen *et al.*, 2001).

Einen hervorragenden Beitrag zum Verständnis der physiologischen Bedeutung der einzelnen NF- κ B/Rel-Proteine haben *knock-out*-Studien geliefert, deren wichtigste Ergebnisse im Folgenden dargestellt sind (zusammengefasst in Gerondakis *et al.*, 1999).

p50/p105 (nfkb1) -/-

Obwohl das nfkb1-Gen ubiquitär exprimiert wird, entwickeln sich die *knock-out*-Mäuse zunächst normal und weisen keine histopathologischen Veränderungen auf. Es treten jedoch Defekte in bestimmten B-Zell-aktivierenden Signalwegen auf. Während die B-Zellen normal auf Antigen-Rezeptorligation reagieren, regt Stimulation mit LPS und löslichem CD40-Ligand keine Proliferation der B-Zellen an. Die Umschaltung zwischen den Immunglobulin-Klassen funktioniert nicht, so dass die humorale Immunantwort gestört ist. Weiterhin ergeben sich Schwierigkeiten bei der Abwehr bestimmter Pathogene (Sha *et al.*, 1995). Differenzierte, ruhende B-Zellen haben eine erhöhte Umsatzrate *in vivo* und sterben vermehrt durch Mitogen induzierte Apoptose (Grumont *et al.*, 1998).

Neuronen aus nfkb1 -/- Mäusen zeigen eine gesteigerte Empfindlichkeit gegenüber oxidativem, excitatorischem und metabolischem Stress (Mattson *et al.*, 2000).

p52/p100 (nfkb2) -/-

Im Gegensatz zu nfkb1 wird das nfkb2-Gen nur im Magenepithel, in der Medulla des Thymus sowie in der Milz und den Lymphknoten exprimiert. Auch nfkb2 defiziente Mäuse entwickeln sich äußerlich normal, ihnen fehlen jedoch Lymphfollikel und die perifollikuläre Marginalzone der Milz, was die Unfähigkeit zu einer normalen T-Zell-abhängigen Antikörperreaktion zur Folge hat. Diese Defizienz scheint allerdings weniger auf einen Defekt in den B- und T-Zellen selbst, als vielmehr auf einen Defekt in der Antigenpräsentation durch Makrophagen und dendritische Zellen zurückzuführen sein (Franzoso *et al.*, 1998).

p65/RelA -/-

Die Deletion des relA-Gens führt zum Tod der Mäuse während der Embryonalentwicklung aufgrund massiv auftretender Apoptose in der Leber (Beg *et al.*, 1995), die durch TNF α verursacht wird, einem der potentesten Aktivatoren von NF- κ B. In Übereinstimmung mit der anti-apoptotischen Funktion von p65 in Hepatocyten wurde gezeigt, dass auch Fibroblasten und Makrophagen von relA -/- Mäusen eine deutlich gesteigerte Apoptoserate nach TNF α -Stimulation aufweisen (Beg und Baltimore, 1996). Generell wird NF- κ B und vor allem p65 enthaltenden Dimeren eine anti-apoptotische Rolle zugesprochen, doch gibt es bestimmte Umstände, unter denen NF- κ B pro-apoptotisch zu wirken scheint (zusammengefasst in Aggarwal, 2000; s. auch 1.1.7). Weiterhin ist p65 ebenso wie p50 für die Mitogen induzierte Proliferation von Lymphocyten und die Umschaltung zwischen den Immunglobulin-Klassen erforderlich (Doi *et al.*, 1997).

relB -/-

RelB wird in dendritischen Zellen und B-Zellen exprimiert. Die hervorstechendsten phänotypischen Eigenschaften der relB-*knock-out*-Mäuse ist die Entwicklung multiorganeller

Entzündungen, eine Vergrößerung der Milz und des Knochenmarks. Die inflammatorischen Reaktionen werden dem Fehlen von bestimmten dendritischen Zellen in Milz und Thymus zugeschrieben, wodurch autoreaktive T-Zellen nicht effektiv deletiert werden, die die persistenten Entzündungen verursachen. RelB ist somit wichtig für die Entwicklung und Differenzierung dendritischer Zellen und spielt daher eine entscheidende Rolle in der zellulären Immunantwort (Burkley *et al.*, 1995; Weih *et al.*, 1995).

c-rel -/-

Die Expression von c-Rel ist auf hämatopoietische Zellen beschränkt. C-rel -/- Mäuse zeigen keine Entwicklungsstörungen, was darauf hinweist, dass c-Rel für die Differenzierung der hämatopoietischen Vorläuferzellen nicht benötigt wird. Es treten aber Defekte in der humoralen und zellulären Immunantwort auf, besonders in der Proliferation von B- und T-Zellen, der Umschaltung zwischen den Immunglobulin-Klassen und der Cytokinproduktion (Köntgen *et al.*, 1995). T-Zellen der Mäuse produzieren reduzierte Mengen von IL-2, IL-3 und GM-CSF und auch Makrophagen zeigen eine abnormale Cytokinproduktion (zusammengefasst in Gerondakis *et al.*, 1999).

Die *knock-out*-Studien unterstreichen die Bedeutung von NF- κ B im Immunsystem. Mit der Entdeckung immer weiterer Stimuli, die den Transkriptionsfaktor aktivieren, und der Identifikation neuer Zielgene wird aber auch die Wichtigkeit von NF- κ B außerhalb des Immunsystems immer deutlicher. Die trifft in erster Linie für die ubiquitär exprimierten Rel-Proteine p50 und p65 zu. Aufgrund des fatalen Phänotyps der p65 defizienten Mäuse können die *knock-out*-Studien hier nur beschränkt Aufschluss geben. Neben den bereits oben aufgeführten Funktionen in Differenzierungsprozessen, Zellwachstum und -proliferation sowie Apoptose wird NF- κ B zunehmend als ein zentraler Regulator der Stressantwort gesehen (Mercurio und Manning, 1999; Pahl, 1999).

1.1.7 Die Rolle von NF- κ B in pathologischen Prozessen

Die Aktivität von NF- κ B ist ein streng regulierter, komplexer Prozess. In den meisten Geweben wird NF- κ B in einem inaktiven Zustand gehalten. Die transiente Induktion des Transkriptionsfaktors ermöglicht dem Organismus, auf pathogene und stressinduzierende Stimuli zu reagieren. Eine Störung dieses fein abgestimmten Vorgangs ist mit einer Reihe von pathologischen Prozessen verbunden, in denen NF- κ B meist eine erhöhte, konstitutive Aktivität aufweist. Dabei sind vor allem chronische entzündliche Erkrankungen und Krebs von Bedeutung (zusammengefasst in Rayet und Gelinas, 1999; Makarov, 2000).

Entzündliche Reaktionen erfordern die Freisetzung von Mediatoren, die zirkulierende Leukocyten in den sich ausbildenden Entzündungsherd rekrutieren. Dort werden die Leukocyten aktiviert und produzieren ihrerseits proinflammatorische Mediatoren, die zur Initiation und Progression des entzündlichen Geschehens beitragen. NF- κ B-Aktivierung

durch die proinflammatorischen Cytokine TNF α und IL-1 in der Initiationsphase führt zur Produktion von weiteren proinflammatorischen Cytokinen und zur Expression von Zell-Zell-Adhäsionsmolekülen wie ICAM-1 und VCAM-1, wodurch die Rekrutierung und Aktivierung der Leukocyten vermittelt wird. Das in den Leukocyten aktivierte NF- κ B induziert nun eine ganze Reihe von proinflammatorischen Zielgenen wie IL-1, IL-2, IL-6, IL-17, TNF α , MCP-1, GM-CSF, COX-2, iNOS und spielt somit ebenfalls eine entscheidende Rolle bei der Progression der Entzündung. Bleibt NF- κ B in den Entzündungsherden aktiviert, so kommt es nicht zur Auflösung der Entzündung durch Bildung antiinflammatorischer Mediatoren und Apoptose der eingewanderten Leukocyten, sondern zur Ausbildung chronisch entzündlicher Erkrankungen. So sind rheumatoide Arthritis, Asthma, chronisch entzündliche Darmerkrankungen, Atherosklerose, Lungenfibrose und Glomerulonephritis durch eine abnormale, konstitutive NF- κ B-Aktivität charakterisiert (zusammengefasst in Chen *et al.*, 1999; Makarov, 2000; Tak und Firestein, 2001). Auch Begleitsymptome der chronischen Entzündungen werden NF- κ B zugeschrieben. So werden NF- κ B-abhängige Metalloproteinasen (MMP) und Osteoklasten, deren Differenzierung ebenfalls durch NF- κ B vermittelt wird, für die Gewebeschädigung in rheumatoider Arthritis verantwortlich gemacht. Des Weiteren besteht wahrscheinlich ein Zusammenhang zwischen persistenter NF- κ B-Aktivierung und den bei chronisch entzündlichen Erkrankungen häufig auftretenden Hyperplasien (Makarov, 2000).

Die Entstehung von Tumoren erfordert eine Reihe von Mutationen, die den Krebszellen ein ungehemmtes Teilungspotential verleihen und gleichzeitig apoptotische Signalwege blockieren. NF- κ B ist an der Regulation des Zellzyklus und der Apoptose beteiligt. Dabei kann der Transkriptionsfaktor sowohl die Zellzyklusprogression wie auch die Apoptose positiv oder negativ beeinflussen, was letztendlich vom Stimulus und dem angesprochenen Gewebe abhängt. Unter den meisten Umständen jedoch scheint NF- κ B die Zellzyklusprogression zu fördern und Apoptose zu hemmen (zusammengefasst in Chen *et al.*, 2001). So ist es nicht verwunderlich, dass in vielen Tumoren eine deutlich erhöhte, konstitutive NF- κ B-Aktivität gefunden wird, was mit verstärktem Tumorstadium und Resistenz gegenüber Chemotherapeutika in Korrelation gebracht wird (Mercurio und Manning, 1999; Rayet und Gelinas, 1999; Wang *et al.*, 1999; Aggarwal, 2000; Chen *et al.*, 2001). Im Zusammenhang mit erhöhter Chemoresistenz ist zu erwähnen, dass NF- κ B eine gesteigerte Expression des *multidrug-resistance*-Transporters 1 (MDR1) bewirkt (Zhou und Kuo, 1997). Zu den Tumoren mit konstitutiv aktiviertem NF- κ B gehören Mammakarzinome, Lungenkarzinome, Schilddrüsenkarzinome, Melanome, Colonkarzinome, Tumore der Prostata und des Gehirns sowie B- und T-Zelleukämien (zusammengefasst in Rayet und Gelinas, 1999).

1.2 Proteintransduktion

Die klassische Gentherapie versucht, genetische Information in Zellen einzubringen, wo die exprimierten Genprodukte eine therapeutische Wirkung entfalten sollen. Wird diese Strategie zur Kompensation monogenetischer Defekte eingesetzt, so muss die Expression des Transgens dauerhaft und gut regulierbar sein. Beispiele hierfür sind die gentherapeutische Behandlung der cystischen Fibrose (Mukoviszidose), der Adenosin-Desaminase (ADA)-Defizienz und der Duchenne-Muskeldystrophie. Die meisten Gentherapie-Ansätze zielen jedoch auf die Behandlung von Krankheiten mit komplexeren genetischen Ursachen ab, wobei die Tumorthherapie den größten Anteil ausmacht. Die eingebrachten Gene sollen dabei direkt oder indirekt zur Apoptose der Tumorzellen führen oder eine tumorspezifische Immunantwort auslösen oder verstärken. Bei diesen Ansätzen ist eine dauerhafte und gut regulierbare Expression des Transgens weniger bedeutend. Vielmehr kommt es auf eine hohe Effizienz, um möglichst *alle* Zielzellen zu erreichen, und eine hohe Konzentration des exprimierten Genprodukts in den Zielzellen an. Hier liegen die Defizite der klassischen Gentherapie, die für den Gentransfer meist virale Vektoren verwendet. Eine Alternative bietet die Proteintransduktionstechnologie, deren Strategie darauf beruht, nicht das Gen, sondern direkt das Genprodukt in die Zellen einzuschleusen (Ford *et al.*, 2001).

Der Begriff Proteintransduktion beschreibt die Fähigkeit von bestimmten Proteinen und Peptiden, in einer rezeptor- und transporterunabhängigen Weise durch biologische Membranen zu translozieren (Schwarze und Dowdy, 2000). In den letzten Jahren ist eine wachsende Zahl von Peptiden und Proteinen ganz unterschiedlicher Herkunft mit dieser Eigenschaft entdeckt worden. Tabelle 1 fasst die Wichtigsten von ihnen zusammen. Sie werden nach exogener Zugabe von lebenden Zellen über einen von der klassischen rezeptorvermittelten Endocytose abweichenden Weg internalisiert. Die Aufnahme in die Zellen erfolgt schnell innerhalb weniger Minuten und ist gleichermaßen effizient bei 37°C und 4°C. Die Proteine gelangen nicht in das lyso-endosomale Kompartiment, sondern direkt in das Cytoplasma, von wo aus sie häufig in den Zellkern weitergeleitet werden. Neben dem Import in Zellen können die Proteine ausgehend vom Cytoplasma auch aus den Zellen exportiert werden. Die Sekretion verläuft ebenfalls auf einem nicht-klassischen Weg ohne Beteiligung des Endoplasmatischen Retikulums und des Golgi-Apparates. Den Proteinen fehlt die dafür notwendige Signalsequenz und für VP22 (s. unten) konnte direkt gezeigt werden, dass eine Inhibition des trans-Golgitransports durch Brefeldin A keinen Einfluss auf die Sekretion hat (Elliott und O'Hare, 1997).

Die Transduktion durch biologische Membranen wird durch kleine Regionen in den Proteinen, die sogenannten Proteintransduktions-Domänen (PTD), vermittelt. Diese umfassen etwa 10-30 Aminosäuren und zeichnen sich durch einen hohen Anteil an basischen Aminosäuren (Lysin und Arginin) aus. In Tabelle 1 sind die Proteintransduktions-Domänen der am besten charakterisierten Proteine mit Transduktionseigenschaft, VP22, Tat und das Antennapedia Homöoprotein (ANTP), angegeben. Allein diese Motive sind ausreichend für die Translokation durch biologische Membranen, so dass eine Reihe von synthetischen

Peptiden mit diesen oder ähnlichen Motiven hergestellt wurde, die nach exogener Zugabe schnell und effizient in Zellen aufgenommen werden, wie etwa die PTD von Tat und die von ANTP abgeleiteten Penetratine (siehe Tabelle 1). Während die PTDs in den Proteinen bestimmte Sekundärstrukturen annehmen, sind die isolierten PTDs eher unstrukturiert und eine definierte Konformation scheint nicht notwendig für die Proteintransduktion zu sein (Calnan *et al.*, 1991; Loret *et al.* 1991; Derossi *et al.*, 1996; Kuelzo *et al.*, 2000). Der genaue Mechanismus der Translokation durch Membranen ist nicht bekannt. Es wird vermutet, dass die PTDs direkt über ihre basischen Aminosäurereste mit negativ geladenen Phospholipiden wechselwirken, was die Ausbildung invertierter Mizellen induziert, durch die die Proteine und Peptide dann direkt in das Cytoplasma gelangen (Derossi *et al.*, 1996; Vives *et al.*, 1997).

Protein	PTD	Referenz
Homöoproteine		
ANTP	RQIKIWFQNRMRMKWKK	Derossi <i>et al.</i> , 1996
Penetratine	KKWKMRRNQFWIKIQR ¹	Derossi <i>et al.</i> , 1998
Engrailed		Joliot <i>et al.</i> , 1998
Hoxa-5		Chatelin <i>et al.</i> , 1996
Hoxb-4		Prochiantz, 2000
Hoxc-8		Prochiantz, 2000
Virusproteine		
VP22 (aus HSV-1)	DAATATRGRSAASRPTERPRAP ARSASRPRRPVE	Elliott und O'Hare, 1997
Tat (aus HIV-1)	YGRKKRRQRRR	Ensoli <i>et al.</i> , 1993
Haemagglutinin (aus Influenza)		Plank <i>et al.</i> , 1994
Andere		
FGF-1		Tarantini <i>et al.</i> , 1998
FGF-2		Keresztes und Boonstra, 1999
Lactoferrin		He und Furmanski, 1995

Tabelle 1: ANTP: Antennapedia Homöoprotein, FGF: Fibroblasten-Wachstumsfaktor (*fibroblast growth factor*) PTD: Proteintransduktions-Domäne. Alle aufgelisteten Proteine und Peptide translozieren auf nicht-klassische Weise durch biologische Membranen. Die Sequenzen der für dieses Phänomen verantwortlichen Proteintransduktions-Domänen sind für die bedeutendsten Vertreter dieser Gruppe aufgeführt.

Das Phänomen der Proteintransduktion hat vor allem deswegen so großes Interesse erfahren, weil festgestellt wurde, dass Peptide, Antikörper, Enzyme und andere Proteine, die mit PTDs fusioniert werden, ebenfalls effizient in Zellen eingeschleust werden, ohne ihre biologische Aktivität zu verlieren. Dabei haben sich vor allem die drei bereits genannten Proteine ANTP, Tat und VP22 sowie die von diesen Proteinen abgeleiteten PTDs hervorgetan, da sie das größte Transduktionspotential besitzen und am effektivsten Fusionsproteine in Zellen

¹ Die Familie der Penetratine umfasst zahlreiche, von der ANTP-Homöodomäne abgeleitete Peptide, von denen hier als Beispiel die Sequenz des Peptids 58-43 angegeben ist. Für einen kompletten Überblick siehe: Prochiantz, 2000.

importieren (Anderson *et al.*, 1993; Fawell *et al.*, 1994; Theodore *et al.*, 1995; Elliott und O'Hare, 1997; Schwarze und Dowdy, 2000).

Antennapedia Homöo-Domäne und Penetratine

Homöoproteine sind ubiquitär vorkommende Transkriptionsfaktoren, die eine wichtige Rolle in der Entwicklung spielen (Gehring, 1987). Die DNA-bindende Homöo-Domäne der Proteine umfasst 60 Aminosäuren und besteht aus drei α -Helices. Die Homöo-Domäne des Antennapedia Proteins (ANTP) aus *Drosophila* ist in der Lage, durch biologische Membranen zu translozieren (Joliot *et al.*, 1991) und diese Translokation wird von der dritten, nur 16 Aminosäuren umfassenden Helix vermittelt (Derossi *et al.*, 1994). Peptide und kleine Proteine, die mit dieser PTD fusioniert wurden, werden nach exogener Zugabe in lebende Zellen aufgenommen (Theodore *et al.*, 1995). Abgeleitet von der ANTP-PTD wurde eine Anzahl von Peptiden mit ähnlichen Sequenzen synthetisiert, die Penetratine (Derossi *et al.*, 1998), die ebenfalls, alleine oder fusioniert mit anderen Peptiden oder kleinen Proteinen, in Zellen importiert werden. Der Einbau von Aminosäuren in die Penetratin-Peptide, die die Ausbildung einer α -helicalen Struktur verhindern, hat keinen Einfluss auf die Transduktionseigenschaft. Ebenso funktioniert die Internalisierung mit Peptiden, die aus D-Aminosäuren zusammengesetzt sind, und sie erfolgt bei 4°C genauso effizient wie bei 37°C. Dies zeigt, dass eine bestimmte Konformation nicht erforderlich ist und dass der Transport nicht rezeptorvermittelt ist (Derossi *et al.*, 1996). Allein die Sequenz und damit die physikochemische Eigenschaft der Peptide scheint von Bedeutung zu sein. Neben den basischen, positiv geladenen Aminosäuren ist das Vorhandensein mindestens einer aromatischen, unpolaren Aminosäure (Tryptophan oder Phenylalanin) in der Sequenz für die Transduktion essentiell (Prochiantz, 2000).

Eine Limitation für den Einsatz von ANTP und der Penetratine für den Import von Proteinen in Zellen ist, dass dieser, im Gegensatz zu Tat und VP22, auf kleine Peptide und Proteine beschränkt ist (Schwarze und Dowdy, 2000; Ford *et al.*, 2001).

Tat aus HIV-1

Das Tat-Protein ist ein 86 Aminosäuren umfassender Transaktivator aus HIV-1, der essentiell für die HIV-Replikation ist. Tat ist eines der ersten beschriebenen Proteine mit Transduktionseigenschaft (Frankel und Pabo, 1988; Green und Loewenstein, 1988). Es wurde entdeckt, dass Fusionsproteine bestehend aus den Aminosäuren 1-72 oder 37-72 von Tat und β -Galactosidase, Meerrettich-Peroxidase, RNase A oder der Domäne III des *Pseudomonas* Exotoxin A ebenfalls nach exogener Zugabe in Zellen importiert werden. In einem Mausmodell wurde die Aufnahme des β -Galactosidase-Fusionsproteins auch *in vivo* demonstriert (Fawell *et al.*, 1994). Die β -Galactosidase konnte in fast allen Geweben, jedoch nicht im Gehirn nachgewiesen werden. Schließlich wurde gezeigt, dass die kurze Region von Aminosäure 47 bis 57 (siehe Tabelle 1) für die Translokation durch biologische Membranen

ausreichend ist und dass Proteine, die mit dieser PTD fusioniert werden, hocheffizient von Zellen aufgenommen werden (Nagahara *et al.*, 1998).

VP22 aus HSV-1

VP22 ist ein Strukturprotein aus dem Herpes simplex-Virus Typ-1 (HSV-1), das in der Tegument-Region, dem Bereich zwischen Capsid und Virushülle, lokalisiert ist. Es wird durch das Gen UL49 kodiert, umfasst 301 Aminosäuren und hat ein Molekulargewicht von 38 kD (Elliott und Meredith, 1992). Die biologische Rolle von VP22 ist bis heute unklar. Das Protein wird in infizierten Zellen durch Nukleotidierung und Phosphorylierung modifiziert, wobei jedoch nur unphosphoryliertes VP22 in Virionen inkorporiert wird (Elliott *et al.*, 1996). Die Phosphorylierung findet spezifisch an Serinresten im N-terminalen und C-terminalen Bereich von VP22 statt und könnte für die Freisetzung des Proteins aus den Viruspartikeln nach Infektion von Bedeutung sein (Morrison *et al.*, 1998; Elliott *et al.*, 1999). Als potentielle Kinasen wurden die zellulären Casein Kinase II (CKII) und PKC sowie die virale UL13 Proteinkinase identifiziert (Elliott *et al.*, 1996; Morrison *et al.*, 1998). Sowohl nach Infektion als auch nach transients Transfektion bindet VP22 in Interphase-Zellen an Mikrotubuli und induziert deren Stabilisierung und Acetylierung (Elliott und O'Hare, 1998). Während der Mitose kommt es zu einer Translokation in den Zellkern und zu einer gleichmäßigen Verteilung von VP22 auf die entstehenden Tochterzellen (Elliott und O'Hare, 2000).

Überraschend war die Beobachtung, dass VP22 nach transients Transfektion aus den ursprünglich transfizierten Zellen exportiert wird und von den benachbarten, nicht transfizierten Zellen aufgenommen wird (Elliott und O'Hare, 1997). In den VP22 exprimierenden Zellen findet man das Protein hauptsächlich im Cytoplasma, wo es an Mikrotubuli bindet, was ein filamentöses Verteilungsmuster zur Folge hat. Nach Import in die Nachbarzellen ist VP22 dort im Zellkern lokalisiert, obwohl es kein klassisches Kernimportsignal besitzt. Über diesen als „*spread*“ bezeichneten interzellulären Transport kann VP22 über bis zu 12 Zellschichten in bis zu 200 Zellen translozieren. Im Zellkern bindet VP22 an Chromatin und wird so bei der Zellteilung auf die Tochterzellen verteilt. Der genaue Mechanismus des *spreads* ist nicht bekannt, der Export des Proteins erfolgt nicht über den klassischen Weg des Endoplasmatischen Retikulums und des Golgi-Apparates. Die Aufnahme von VP22 erfordert ein intaktes Aktin-Cytoskelett. Neben dem beschriebenen *spread* wird VP22 genau wie Tat und ANTP auch nach exogener Zugabe von Zellen internalisiert. Dies erfolgt innerhalb von 5 min und geschieht bei 4°C genauso effizient wie bei 37°C, was gegen einen rezeptorvermittelten Weg spricht. Unerlässlich für den Transmembran-Transport von VP22 ist die C-terminale Domäne der Aminosäuren 267-301, die ebenfalls die Bindung an Chromatin vermittelt (Elliott und O'Hare, 1997). Diese PTD wie auch das gesamte VP22 Protein zeichnet sich analog den PTDs von ANTP und Tat durch einen hohen Anteil an basischen Aminosäureresten aus (vgl. Tabelle 1).

Von Bedeutung ist, dass der interzelluläre Transport und die Aufnahme nach exogener Zugabe nicht nur mit Wildtyp-VP22 funktioniert, sondern ebenfalls mit VP22-Fusionsproteinen, die dabei ihre biologische Aktivität behalten, was u. a. für GFP (Aints *et al.*, 1999; Elliott und O'Hare, 1999; Wybranietz *et al.*, 1999), p53 (Phelan *et al.*, 1998) und die HSV-1 Thymidin-Kinase (Dilber *et al.*, 1999) gezeigt wurde.

1.3 Zielsetzung der Arbeit

Die Rolle von NF- κ B in vielen pathologischen Prozessen (s. 1.1.7) macht den Transkriptionsfaktor zu einem attraktiven Ziel therapeutischer Intervention (Makarov, 2000). Im Rahmen der Arbeit sollte untersucht werden, ob die Proteintransduktionstechnologie dazu eingesetzt werden kann, um Proteine in Zellen einzuschleusen, die die Aktivierung von NF- κ B verhindern oder bereits aktiviertes NF- κ B inhibieren können. Dafür wurde das VP22 System gewählt, da es 1. zusammen mit Tat am effektivsten Fusionsproteine in Zellen importieren kann und es 2. aufgrund seiner *spread*-Eigenschaft zusätzlich die Möglichkeit bietet, Fusionskonstrukte auch als Gene in Zellen einzubringen, deren Expression eine Verteilung der VP22-Fusionsproteine in nahezu 100% der Zielzellen zur Folge haben kann. Als NF- κ B-Inhibitoren sollten das I κ B-Protein I κ B α sowie das NF- κ B/Rel-Protein p65 ohne Transaktivierungsdomäne (p65 Δ TAD) getestet werden. I κ B α besitzt im Gegensatz zu anderen I κ B-Proteinen die Fähigkeit, NF- κ B sowohl im Cytoplasma als auch im Zellkern zu inhibieren (s. 1.1.2). Aufgrund seiner ubiquitären Expression ist p65 Bestandteil der Mehrheit der im Organismus transkriptionell aktiven NF- κ B-Dimere. P65 Δ TAD kann weiterhin mit anderen Rel-Proteinen dimerisieren und an seine κ B-Erkennungsmotive in der DNA binden, ist aber transkriptionell inaktiv. Diese Eigenschaften ließen I κ B α und p65 Δ TAD als geeignete Kandidaten für eine spezifische Inhibierung von NF- κ B erscheinen und sie wurden daher als VP22-Fusionspartner gewählt.

2 Material und Methoden

2.1 Reagenzien, Antikörper und Enzyme

Soweit nicht anders verzeichnet, wurden alle Reagenzien über Merck (Darmstadt), Roth (Karlsruhe) oder Sigma (Deisenhofen) bezogen.

TNF α wurde von der Knoll AG (Ludwigshafen), PMA (Phorbolmyristylacetat) von Sigma erhalten. D-Luciferin, freie Säure, stammte von Appllichem (Darmstadt) und wurde als 3 mg/ml Stammlösung in 100% Ethanol angelegt. Das 21 Aminosäuren umfassende Importpeptid Pep-1 wurde unter dem Produktnamen ChariotTM von der Firma Active Motif (Rixensart, Belgien) erworben. Es besitzt die Sequenz KETWWETWWTEWSQPKKKRKV und ist N-acetyliert. Pep-1 wurde in einer Konzentration von 2 mg/ml in ddH₂O gelöst. Restriktionsenzyme wurden von den Firmen Roche Molecular Biochemicals (Mannheim) und Invitrogen (Groningen, Niederlande) bezogen.

Polyklonaler Kaninchen-anti-I κ B α und monoklonaler Maus-anti-Aktin Antikörper wurden von Santa Cruz (Heidelberg), monoklonaler Maus-anti-CMV Epitop Antikörper (CMV-018-48151) von Capricorn Products (Scarborough ME, USA) und monoklonaler Maus-anti-RGSHis₄-Epitop Antikörper von Qiagen (Hilden) erworben. Der polyklonale Kaninchen-anti-VP22 Antikörper AGV30 stammte aus dem Labor von Dr. P. O'Hare (MCRI, London, UK) und wurde freundlicherweise von Wolfgang Wybranietz (Universitätsklinik Tübingen) zur Verfügung gestellt. Die für die indirekte Immunfluoreszenz eingesetzten sekundären Antikörper Ziege-anti-Kaninchen IgG Rhodamin gekoppelt, Ziege-anti-Maus IgG Rhodamin gekoppelt, Ziege-anti-Kaninchen OregonGreenTM 488 gekoppelt und Ziege-anti-Maus OregonGreenTM 488 gekoppelt wurden von Molecular Probes (Eugene OR, USA) erhalten. Die sekundären HRP (*horse-radish peroxidase*, Meerrettich-Peroxidase) gekoppelten Antikörper für Western-Blots wurden von Calbiochem (Bad Soden) erworben.

2.2 Klonierung bakterieller und eukaryontischer Expressionsvektoren

2.2.1 Hergestellte Konstrukte

Im Folgenden werden die Ausgangsvektoren und die Herstellung der Inserts für die in der vorliegenden Arbeit produzierten und verwendeten Konstrukte beschrieben. Wurde ein Insert mittels PCR gewonnen, so sind die entsprechenden Primer angegeben.

Eukaryontische Expressionsvektoren

Der Ausgangsvektor pc49ep+2 war ein Geschenk von Wolfgang Wybranietz (Universitätsklinik Tübingen). Der von pcDNA1 abgeleitete Vektor umfasst 6031 bp und enthält ein Ampicillin-Resistenzgen. Die komplette VP22 codierende Sequenz ist unter der Kontrolle eines CMV-Promotors. Als Klonierungsstellen sind lediglich eine BglII-Schnittstelle vor sowie eine BamHI-Schnittstelle nach der VP22-Sequenz vorhanden (Leslie *et al.*, 1996).

Für die nachfolgend aufgelisteten Konstrukte diente pGEX2T (Amersham Pharmacia, Freiburg) mit einkloniertem IκBα bzw. RcCMVp65 (Schmitz und Baeuerle, 1991) als *template*.

Konstrukt	Insertgewinnung/Primer
BglII- GST-IκBα -BglII- VP22	5': 5'-GGGAGATCTACCATGTCCCTATACTAGGTTATTG-3' 3': 5'-GGGAGATCTTAACGTCAGACGCTGGCCTCC-3'
VP22 -BamHI/BglII- GST-IκBα -BglII/BamHI	5': 5'-GGGAGATCTCATGTCCCTATACTAGGTTATTG-3' 3': 5'-GGGAGATCTTCATAACGTCAGACGCTGGCCTCC-3'
VP22 -BamHI/BglII- IκBα -BglII/BamHI	5': 5'-GGGAGATCTCATGTTCCAGGCGGCCGAGCGC-3' 3': 5'-GGGAGATCTTCATAACGTCAGACGCTGGCCTCC-3'
VP22 -BamHI/BglII- Δ_NIκBα -BglII/BamHI	5': 5'-GGGAGATCTCACCGAGGACGGGGACTCGTTC-3' 3': 5'-GGGAGATCTTCATAACGTCAGACGCTGGCCTCC-3'
BglII- IκBα -BglII/BamHI	5': 5'-GGGAGATCTCATGTTCCAGGCGGCCGAGCGC-3' 3': 5'-GGGAGATCTTCATAACGTCAGACGCTGGCCTCC-3' VP22 wurde zuvor aus pc49ep+2 herausgeschnitten
VP22 -BamHI- p65ΔTAD -BamHI	5': 5'-CCCGGATCCCATGGACGAACTGTTCCCCTCATC-3' 3': 5'-GCGGGATCCTCATGACGTAAAGGGATAGGGCTGGGG-3'
BglII/BamHI- p65ΔTAD -BamHI/BglII- VP22	5': 5'-CCCGGATCCACCATGGACGAACTGTTCCCCTCATC-3' 3': 5'-CCCGGATCCGGAGCTGATCTGACTCAGCAGGG-3'
BglII/BamHI- p65ΔTAD -BamHI	5': 5'-CCCGGATCCACCATGGACGAACTGTTCCCCTCATC-3' 3': 5'-GCGGGATCCTCATGACGTAAAGGGATAGGGCTGGGG-3' VP22 wurde zuvor aus pc49ep+2 herausgeschnitten
BglII- VP22 -BamHI	Lag bereits in pc49ep+2 vor

Die den aufgeführten Konstrukten entsprechende Konstrukte mit C-terminalem CMV-Epitop wurden über 3'-Primer synthetisiert, die sich von den oben angegebenen nur durch das Fehlen eines Stopcodons unterscheiden. Die ebenfalls verwendeten Plasmide mit VP22-GFP und VP22-TK wurden von Wolfgang Wybranietz zur Verfügung gestellt.

Vektoren für die Herstellung rekombinanter Baculoviren

Für die Herstellung rekombinanter Baculoviren wurden die gewonnenen Inserts in den Transfektor pBlueBacHis2 A (Invitrogen, Groningen, Niederlande) einkloniert (s. auch 2.7). Der Vektor liefert einen 6x-Histidin-Tag (His)₆, so dass das baculoviral exprimierte Protein mittels dieses N-terminal lokalisierten Tags über Ni-NTA Metall-Affinitätschromatographie aufgereinigt werden kann.

Konstrukte	Insertgewinnung/Primer
BamHI/BglII- VP22-IκBα -BamHI/BglII	Herstellung von BglII-IκBα-BamHI: 5' : 5'-GGGAGATCTCATGTTCCAGCGGCCGAGCGC-3' 3' : 5'-CCCGATCCTCATAACGTCAGACGCTGGCCTCC-3' Template: pGEX2T-IκBα Einklonieren in BamHI geschnittenen pc49ep+2 Ausschneiden von VP22-IκBα mit BglII und BamHI aus pc49ep+2/IκBα
BamHI/BglII- VP22 -BamHI/BglII	Ausschneiden von VP22 mit BglII und BamHI aus pc49ep+2
BamHI- IκBα -EcoRI	Ausschneiden von IκBα mit BamHI und EcoRI aus pGEX2T-IκB

Vektoren für die Proteinexpression in *E. coli*

Für die Expression von Proteinen in *E. coli* wurden die Vektoren pGEX6P2 (N-terminale GST-Fusion / Amersham Pharmacia) und pET28(a)+ (N-terminales (His)₆-Epitop / Novagen, Madison WI, USA) verwendet.

Konstrukte	Primer
GST -BamHI- 22Δ159-IκBα -EcoRI	5' : 5'-GCCGGATCCTCGACGGCGCCAACCCGATCCAAG-3' 3' : 5'-GGGGAATTCTCATAACGTCAGACGCTGGCCTCC-3' Template: VP22-IκBα in pc49ep+2
GST -BamHI- 22Δ159-Δ_NIκBα -EcoRI	5' : 5'-GCCGGATCCTCGACGGCGCCAACCCGATCCAAG-3' 3' : 5'-GGGGAATTCTCATAACGTCAGACGCTGGCCTCC-3' Template: VP22-Δ _N IκBα in pc49ep+2
GST -BamHI- 22Δ267-IκBα -EcoRI	5' : 5'-CGGGGATCCGACGCGGCCACGGCGACTCGAG-3' 3' : 5'-GGGGAATTCTCATAACGTCAGACGCTGGCCTCC-3' Template: VP22-IκBα in pc49ep+2
GST -BamHI- 22Δ267-Δ_NIκBα -EcoRI	5' : 5'-CGGGGATCCGACGCGGCCACGGCGACTCGAG-3' 3' : 5'-GGGGAATTCTCATAACGTCAGACGCTGGCCTCC-3' Template: VP22-Δ _N IκBα in pc49ep+2
GST -BamHI- IκBα -EcoRI	Direktes Umklonieren aus pGEX2T-IκBα in pGEX6P2
(His)₆ -BamHI- IκBα -EcoRI	Direktes Umklonieren aus pGEX2T-IκBα in pET28(a)+
GST -BamHI- 22Δ159 -EcoRI	5' : 5'-GCCGGATCCTCGACGGCGCCAACCCGATCCAAG-3' 3' : 5'-CGCGAATCCTCGACGGCCGCTCTGGGGCG-3' Template: pc49ep+2
GST -BamHI- 22Δ159 -Eco-NotI- p65ΔTAD -NotI	5' : 5'-GTGGCGGCCGCCATGGACGAACTGTTCCCCCTC-3' 3' : 3'-GTGGCGGCCGCTCATGACGTAAGGGATAGGGC-3' Template: RcCMVp65 (s.o.)
GST -BamHI- p65ΔTAD -NotI	5' : 5'-CCCGATCCACCATGGACGAACTGTTCCCCCTC-3' 3' : 3'-GTGGCGGCCGCTCATGACGTAAGGGATAGGGC-3' Template: RcCMVp65
(His)₆ -BamHI- p65ΔTAD -BamHI- 22Δ159 -EcoRI	5' : 5'-CCGGATCCACCATGGACGAACTGTTCCCCCTC-3' 3' : 5'-CCCGATCCGGAGCTGATCTGACTCAGCAGGG-3' Template: RcCMVp65
(His)₆ -BamHI- p65ΔTAD -NotI	Direktes Umklonieren aus pGEX6P2-p65ΔTAD in pET28(a)+

2.2.2 PCR, Restriktion und Ligation

Die PCR-Reaktionen zur Herstellung der unter 2.2.1 beschriebenen Inserts (präparative PCR) wurden mit der Platinum®-Pfx DNA Polymerase (Life Technologies, Karlsruhe) durchgeführt, während für Kontroll-PCR-Reaktionen herkömmliche Taq-Polymerase (Eppendorf, Hamburg) verwendet wurde. Die PCR-Bedingungen wurden für jedes Konstrukt angepasst und optimiert. Die 50 µl PCR-Ansätze enthielten 5 µl des entsprechenden 10x Puffers, 1-2 mM MgSO₄ oder MgCl₂, 1 ng *template*-DNA, 0,4 µM der 5'- und 3'-Primer, 0,4 mM jedes dNTPs sowie 1,25 U Pfx- oder Taq-Polymerase. Für eine präparative PCR wurden auf Eis 6-12 Ansätze pipettiert, die mit jeweils 100 µl Mineralöl überschichtet wurden. Die PCR-Reaktionen wurden in einem RoboCycler® Gradient 40 (Stratagene, La Jolla CA, USA) ausgeführt. Nach einem initialen Denaturierungsschritt bei 95°C für 3 min wurden 28-32 Zyklen durchlaufen, und zwar mit 50 sek Denaturierung bei 95°C, 1 min Primeranlagerung (*annealing*) bei 58-62°C (je nach Schmelztemperatur des eingesetzten Primerpaares) und 1 min pro 500 bp der zu vervielfältigenden Matrize (*template*) bei 72°C für die Synthese (*extension*). Zum Abschluss wurden die Reaktionsansätze für 5 min bei 72°C gehalten, bevor sie bei 4°C gelagert wurden. Jeweils 5 µl der PCR-Reaktionen wurden auf einem 1,5 %igen Agarosegel analysiert. Der Rest der Ansätze wurde vereinigt und mittels des PCR-*Purification-Kits* (Qiagen) aufgereinigt.

Anschließend wurden die PCR-Produkte in einem Gesamtvolumen von 50 µl mit jeweils 10 U der entsprechenden Restriktionsenzyme (vgl. 2.2.1) für 3 h bei 37°C inkubiert und erneut unter Verwendung des PCR-*Purification-Kits* (Qiagen) gereinigt. Ebenso wurden 5-10 µg Vektor-DNA in einem Volumen von 100 µl mit jeweils 20 U der entsprechenden Restriktionsenzyme für 3-4 h bei 37°C geschnitten und über ein präparatives 1%iges Agarosegel mittels des *Gel-Extraction-Kits* (Qiagen) aufgereinigt. Sowohl vom PCR-Produkt wie auch vom verdauten Vektor wurde die Konzentration durch Messung der Absorption bei 260 nm (GeneQuant II, Pharmacia Biotech, Freiburg) bestimmt.

Wenn der Vektor nur mit einem Restriktionsenzym linearisiert wurde, so wurde er vor der Ligation dephosphoryliert. Dazu wurden 21,5 µl geschnittene und gereinigte Vektor-DNA mit 2,5 µl SAP (*shrimp alkaline phosphatase*)-10x Puffer und 1 µl SAP (1 U/µl; Amersham Pharmacia) für 60 min bei 37°C inkubiert. Die SAP wurde anschließend für 20 min bei 65°C denaturiert und der dephosphorylierte Vektor konnte direkt ohne einen weiteren Reinigungsschritt für die Ligation verwendet werden.

Zur Ligation wurden Insert und Vektor in einem Molverhältnis von 2:1 bis 3:1 bei einer Gesamt-DNA-Menge von 400-800 ng eingesetzt. Die entsprechenden Mengen von Insert und Vektor wurden in einem Gesamtvolumen von 20 µl mit 1 U T4-Ligase (Life Technologies) in T4-Ligase-Puffer für 3-16 h bei 16°C (Thermomixer comfort, Eppendorf) inkubiert. 1 µl der Ligationsansätze wurde zur Transformation mittels Elektroporation von elektrokompenten *E. coli* (XL-Blue) eingesetzt.

2.3 Transformation

2.3.1 Herstellung elektrokompenter Zellen

Die Bakterien wurden auf LB-Agar ausgestrichen und über Nacht bei 37°C inkubiert. Am nächsten Morgen wurden mit einer gepickten Kolonie 5 ml LB-Medium angeimpft und die Kultur wurde bei 37°C geschüttelt, bis eine Trübung zu erkennen war. Anschließend wurde die gesamte Kultur zu 400 ml LB-Medium gegeben. Es wurde bei 37°C geschüttelt, bis eine OD₆₀₀ von 0,3 erreicht wurde. Die Bakterien wurden 10 min auf Eis gestellt und dann bei 4°C in einem Sorvall GS3 Rotor für 15 min bei 6000 rpm geerntet. Die Zellen wurden in 10 ml eiskaltem 1 mM HEPES, pH 7,0 resuspendiert, mit 1 mM HEPES, pH 7,0 auf 400 ml aufgefüllt und erneut pelletiert. Nach einmaliger Wiederholung des vorherigen Schrittes wurde das Bakterienpellet in 10 ml eiskaltem sterilem 10%igem Glycerol resuspendiert und bei 4°C in einem Sorvall SS34 Rotor für 15 min bei 4°C zentrifugiert. Die Zellen wurden schließlich in 0,8 ml 10%igem Glycerol aufgenommen und aliquotiert (80 µl), die Aliquots in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei -80°C aufbewahrt.

2.3.2 Elektroporation

Zur Transformation wurden 1 µl der Ligationsansätze oder 10 ng von gereinigter Plasmid-DNA eingesetzt. Die DNA wurde zu einem Aliquot elektrokompenter Zellen, die auf Eis aufgetaut wurden, gegeben. Der Ansatz wurde in eine gekühlte Elektroporationsküvette (Ø = 2 mm) pipettiert und einem Stromimpuls (5 ms, 2,5 kV; MicroPulser®, Biorad, München) ausgesetzt. Nach direkter Zugabe von 1 ml auf RT erwärmtem LB-Medium wurde der Transformationsansatz 1 h bei 37°C in einem 15 ml Kulturröhrchen geschüttelt. Danach wurden 10-200 µl der Kultur auf LB-Amp-Platten ausplattiert, die über Nacht bei 37°C inkubiert wurden.

2.4 Plasmidpräparation

2.4.1 Plasmidkontrolle durch Mini-Präparation

Von den LB-Amp-Platten wurden Kolonien gepickt und mit diesen jeweils 4 ml LB-Amp-Medium angeimpft. Die Kulturen wurden über Nacht bei 37°C geschüttelt. Am nächsten Tag wurden 2 ml der Kulturen in ein 2 ml Eppendorfgefäß überführt und die Bakterien bei 11000 rpm, RT, für 1 min pelletiert (Biofuge fresco, Heraeus). Die Zellen wurden in 300 µl GTE-Puffer (250 mM Tris-HCl, pH 8,0, 100 mM EDTA, 500 mM Glucose, 0,5 mg/ml RNase) resuspendiert. Nach Zugabe von 600 µl 0,2 M NaOH/1% SDS erfolgte die Lyse der Bakterien für 5 min bei RT. Anschließend wurden 450 µl eiskaltes 3 M Na-Acetat, pH 4,8 zupipettiert und die Lysate für 5 min auf Eis inkubiert. Das SDS-Präzipitat wurde 30 min bei 13000 rpm und 4°C (Biofuge fresco, Heraeus) abzentrifugiert und jeweils 1 ml des klaren Überstands in ein neues 2 ml Eppendorfgefäß überführt. Die Plasmid-DNA wurde durch Zugabe von 700 µl

Isopropanol (0,7 Volumenanteil) gefällt und direkt für 20 min bei 13000 rpm und 4°C pelletiert (Biofuge fresco, Heraeus). Das DNA-Pellet wurde einmal mit 70% Ethanol gewaschen, für 5-10 min bei RT getrocknet und in 40 µl ddH₂O aufgenommen. 4 µl der Plasmid-DNA wurde in einem Gesamtvolumen von 20 µl durch Verdau mit entsprechenden Restriktionsenzymen kontrolliert. Die Restriktionskontrolle wurde auf einem 1,5%igen Agarosegel analysiert.

Von dem Rest der Kulturen, die den gewünschten Plasmid beherbergen, wurden Glycerolstocks angelegt, wozu 850 µl der Kultur in einem Kryoröhrchen mit 150 µl sterilem Glycerin gemischt und bei -80°C eingefroren wurden.

2.4.2 Maxi-Präparation

Mit einer sterilen Impföse wurden Bakterien aus einem Glycerolstock auf einer LB-Amp-Platte ausgestrichen, die über Nacht bei 37°C inkubiert wurde. Am nächsten Tag wurde mit einer gepickten Kolonie der Platte 3 ml LB-Amp-Medium angeimpft und die Startkultur bei 37°C für 8 h geschüttelt. 150 ml LB-Amp-Medium wurden dann in einem sterilen Erlenmeyerkolben mit 200 µl der Startkultur versetzt. Der Kolben wurde über Nacht bei 37°C in einen Schüttler gestellt. Die Bakterien wurden am nächsten Morgen in einem GS3 Rotor bei 4°C, 5000 rpm für 15 min pelletiert und die Plasmid-DNA mit dem HiSpeedTM Plasmid Purification Kit von Qiagen entsprechend dem Protokoll des Herstellers isoliert. Sollte das Plasmid zur Transfektion eingesetzt werden, so wurde die Plasmid-DNA nach Zugabe von Na-Acetat zu einer finalen Konzentration von 0,3 M mit 2 Volumenanteilen 100% Ethanol für 5 min bei RT gefällt und zweimal mit 70% Ethanol gewaschen. Die DNA wurde danach unter einer Sterilbank für 5 min getrocknet und in 100-300 µl sterilem TE-Puffer (10 mM Tris-HCl, pH 8,0, 1 mM EDTA) gelöst. Nach Bestimmung der Konzentration (GeneQuant II, Pharmacia Biotech) wurde die Plasmid-DNA aliquotiert und bei -20°C gelagert.

2.5 Expression und Aufreinigung rekombinanter Proteine in *E. coli*

Proteine wurden in dem *E. coli* Stamm BL21 (DE3) exprimiert. Dazu wurden BL21 (DE3) Zellen wie unter 2.3.2 beschrieben mit den präparierten Expressionsplasmiden transformiert. Die optimalen Expressionsbedingungen (Dichte der Kultur, IPTG-Konzentration, Kultivierungstemperatur) wurden zunächst in kleinen 8 ml Kulturen ausgetestet. Für die Proteinreinigung wurden dann 2-4 Liter *E. coli* BL21 (DE3) Kultur unter optimalen Bedingungen induziert und in einem GS3 Rotor bei 4°C, 5000 rpm für 15 min geerntet. Das Bakterienpellet wurde einmal mit eiskaltem PBS gewaschen, in flüssigem Stickstoff eingefroren und bis zur Reinigung bei -80°C gelagert.

Die nachfolgend beschriebenen Reinigungsschritte über Säulen wurden mit einer Waters 650 HPLC-Anlage durchgeführt (Waters, Eschborn).

I κ B α , 22 Δ 267-I κ B α und 22 Δ 267- Δ _NI κ B α als GST-Fusionsproteine

Die Bakterien wurden bei einer OD₆₀₀ von 0,6 für 4 h induziert und wie beschrieben geerntet. Die Bakterienpellets von 2 Liter Kultur wurden bei RT aufgetaut und in 40 ml eiskaltem PBS, 0,5% (v/v) Triton X-100, 2 mM DTT, je 3 μ g/ml Aprotinin, Leupeptin und Pepstatin A, 0,5 mM PMSF resuspendiert. Die Suspension wurde dann 30 min mit 1 mg/ml Lysozym unter Rühren auf Eis inkubiert. Nach Zugabe von Sarkosyl zu einer finalen Konzentration von 1 % (w/v) erfolgte der Aufschluss der Bakterien für 6 x 30 sek durch Ultraschall (Sonoplus HD 2070, Cycle 9, Titanteller TT13; Bandelin, Berlin). Zellwand- und Membranbruchstücke wurden bei 20000 rpm, 4°C für 30 min abzentrifugiert (SS34 Rotor). Der klare Überstand wurde mit einer Flussrate von 2 ml/min auf eine mit 25 ml GSH-Sepharose 4 Fast Flow gepackten XK-16 Säule (Amersham Pharmacia) aufgetragen, die vorher mit PBS + 2 mM DTT äquilibriert worden war. Die Säule wurde mit PBS + 2 mM DTT gewaschen, bis kein Protein mehr im Durchlauf detektiert wurde. Anschließend wurde mit 50 mM Tris-HCl, pH 8,0, 100 mM NaCl, 20 mM GSH eluiert und das Eluat in 3 ml Fraktionen gesammelt. Die Eluate, die das GST-Fusionsprotein enthielten, wurden vereinigt und über Nacht gegen 50 mM Tris-HCl, pH 8,0, 200 mM NaCl, 1 mM DTT dialysiert. Nach Zugabe von Triton X-100 zu einer finalen Konzentration von 0,01% (v/v) wurde zur Entfernung des GST mit 1,5 U PreScission-Protease (Amersham Pharmacia)/100 μ g GST-Fusionsprotein für 8 h bei 5°C verdaut. Während des Verdaus präzipitierte Proteine wurden bei 5000 rpm, 4°C für 20 min (Biofuge Stratos, Heraeus) abzentrifugiert. Der klare Überstand wurde mit einer Flussrate von 1 ml/min auf eine 1 ml Mono-Q-Säule (Amersham Pharmacia), die mit 50 mM Tris-HCl, pH 8,0, 200 mM NaCl, 1 mM DTT äquilibriert worden war, aufgetragen und die Säule mit 50 mM Tris-HCl, pH 8,0, 200 mM NaCl, 1 mM DTT gewaschen, bis kein GST im Durchlauf mehr detektiert wurde. Im Anschluss daran wurden das gebundene I κ B α , 22 Δ 267-I κ B α oder 22 Δ 267- Δ _NI κ B α mit 50 mM Tris-HCl, pH 7,2, 500 mM NaCl, 1 mM DTT eluiert. Nach Bestimmung der Proteinkonzentration wurden die Proteine aliquotiert, in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei -80°C gelagert.

22 Δ 159-I κ B α und 22 Δ 159- Δ _NI κ B α als GST-Fusionsproteine

BL21 (DE3) Zellen mit den Expressionsplasmiden für GST-22 Δ 159-I κ B α und GST- 22 Δ 159- Δ _NI κ B α wurden wie oben beschrieben induziert, geerntet und lysiert. Um eine effektive Bindung an die GSH-Sepharose-Säule zu erreichen, war es jedoch notwendig, eine Vorreinigung über Q-Sepharose durchzuführen. Dazu wurde das klare Lysat nach dem Sonifizieren und der Zentrifugation auf einen pH-Wert von 8,0 eingestellt und mit 5 ml Q-Sepharose Fast Flow (Amersham Pharmacia) pro Liter Bakterienkultur für 1 h bei 4°C auf einem Schüttler inkubiert. Die Q-Sepharose wurde dann mit 40 ml 50 mM NaH₂PO₄, pH 8,0, 160 mM NaCl, 1 mM DTT pro 5 ml Q-Sepharose gewaschen und die Proteine anschließend mit 20 ml 50 mM NaH₂PO₄, pH 7,0, 700 mM NaCl, 1 mM DTT, je 2 μ g/ml Aprotinin,

Leupeptin und Pepstatin A, 0,2 mM PMSF pro 5 ml Q-Sepharose eluiert. Nach 4 h Dialyse gegen PBS + 2 mM DTT wurden erneut Proteaseinhibitoren zugegeben und das Dialysat auf die GSH-Sepharose-Säule aufgetragen. Die weitere Aufreinigung erfolgte entsprechend dem Protokoll für I κ B α , 22 Δ 267-I κ B α und 22 Δ 267- Δ _NI κ B α .

22 Δ 159 als GST-Fusionsprotein

Die Expression, die Lyse und die Reinigung über die GSH-Sepharose-Säule wurde wie für I κ B α , 22 Δ 267-I κ B α und 22 Δ 267- Δ _NI κ B α beschrieben durchgeführt. Das Eluat der GSH-Sepharose wurde über Nacht gegen 50 mM Tris-HCl, pH 7,2, 150 mM NaCl, 1 mM DTT dialysiert. Es wurde dann für 8 h bei 5°C mit 1,5 U PreScission-Protease pro 100 μ g GST-22 Δ 159 verdaut. Ausgefällene Proteine wurden bei 5000 rpm, 4°C für 20 min (Biofuge Stratos, Heraeus) abzentrifugiert und der klare Überstand mit einer Flussrate von 1 ml/min auf eine 1 ml Mono-S-Säule, die mit 50 mM NaH₂PO₄, pH 7,2, 150 mM NaCl, 1 mM DTT äquilibriert worden war, aufgetragen. Die Mono-S-Säule wurde anschließend mit dem Äquilibrierungspuffer gespült, bis kein GST mehr im Durchlauf detektiert wurde. Das gebundene 22 Δ 159 wurde mit 50 mM NaH₂PO₄, pH 8,0, 500 mM NaCl, 1 mM DTT eluiert. Nach Bestimmung der Proteinkonzentration wurde das Eluat aliquotiert, in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei -80°C aufbewahrt.

I κ B α mit N-terminalem (His)₆-Epitop

BL21 (DE3) Zellen mit dem Expressionsplasmid pET28(a)+ I κ B α wurden wie die GST-Fusionsproteine induziert und geerntet. Die Bakterienpellets von 2 Liter Kultur wurden bei RT aufgetaut und in 40 ml eiskaltem Startpuffer (50 mM NaH₂PO₄, 400 mM NaCl, 0,1% (v/v) Triton X-100, 10 mM Imidazol, 5 mM β -Mercaptoethanol, pH 8,0) resuspendiert. Es wurde Triton X-100 zu einer finalen Konzentration von 0,5% (v/v) und je 3 μ g/ml Aprotinin, Leupeptin und Pepstatin A sowie 0,5 mM PMSF zugegeben. Die Suspension wurde danach 30 min mit 1 mg/ml Lysozym unter Rühren auf Eis inkubiert und die Bakterien für 5 x 30 sek durch Ultraschall aufgeschlossen (Sonoplus HD 2070, Cycle 9, Titanteller TT13; Bandelin). Zellwand- und Membranbruchstücke wurden bei 20000 rpm, 4°C für 30 min abzentrifugiert (SS34 Rotor). Der klare Überstand wurde mit einer Flussrate von 2 ml/min auf eine mit 10 ml Ni-NTA-Agarose Fast Flow (Invitrogen) gepackten XK-16 Säule (Amersham Pharmacia) aufgetragen, die vorher mit Startpuffer äquilibriert worden war. Die Säule wurde mit Startpuffer gespült, bis kein Protein mehr im Durchlauf detektiert wurde. Anschließend wurden unspezifisch gebundene Proteine mit Waschpuffer (50 mM NaH₂PO₄, 400 mM NaCl, 0,1% (v/v) Triton X-100, 20 mM Imidazol, 5 mM β -Mercaptoethanol, pH 8,0) von der Säule entfernt. Eluiert wurde mit einem 50 ml linearen Gradienten von 100% Waschpuffer zu 100% Elutionspuffer (50 mM NaH₂PO₄, 400 mM NaCl, 250 mM Imidazol, 5 mM β -Mercaptoethanol, pH 8,0). Die Eluate wurden über Nacht gegen 50 mM Tris-HCl, pH 8,0, 200 mM

NaCl, 1 mM DTT dialysiert. Die dialysierten Eluate wurden dann, wie für IκBα, 22Δ267-IκBα und 22Δ267-Δ_NIκBα beschrieben, über eine Mono-Q-Säule fraktioniert.

2.6 Insektenzellkultur

Die verwendete Insektenzelllinie Sf-9 hat ihren Ursprung in der Zelllinie IPLBSF-21, die aus den Ovarien von *Spodoptera frugiperda* Larven entstammt (Vaughn *et al.*, 1977; O'Reilly *et al.*, 1992). Sf-9 Zellen wurden bei 27°C in SF-900 II Medium kultiviert, das mit 10% hitzeinaktiviertem FCS, 100 U/ml Penicillin und 0,1 mg/ml Streptomycin (alles von Life Technologies) supplementiert wurde. Wenn die Zellen eine Konfluenz von 100% aufwiesen, wurden sie durch vorsichtiges Abspülen mit Medium oder durch leichtes Klopfen abgelöst und in einer 1/5 Verdünnung passagiert. Da Sf-9 Zellen nach der 30. Passage langsam ihre Viabilität und die Infizierbarkeit durch Baculoviren verlieren, ist es wichtig, zu Beginn einen großen Vorrat an kryokonservierten Zellen anzulegen, auf den zurückgegriffen werden kann. Dazu wurden die Zellen in einer Dichte von 1×10^7 Zellen/ml in 60% SF900 II, 30% FCS und 10% DMSO für eine Stunde bei -20°C eingefroren und anschließend für 24-48 h bei -80°C gelagert, bevor sie in flüssigen Stickstoff überführt wurden.

2.7 Herstellung von rekombinanten Baculoviren

Zur Herstellung rekombinanter Baculoviren wurde das Bac-N-Blue™ Kit verwendet (Invitrogen). Dabei werden Sf-9 Zellen mit dem pBlueBacHis2A Vektor, in den das Gen von Interesse einkloniert wurde, zusammen mit linearisierter Virus-DNA cotransfiziert. Während der Transfektion kommt es zur Rekombination von linearisierter Virus-DNA und Vektor-DNA, durch die ein ringförmiges DNA-Molekül entsteht, das alle für die Virusreplikation notwendigen Sequenzen enthält. Das zu exprimierende Gen ist nun unter der Kontrolle eines Polyhedrin-Promotors. Ebenso entsteht nach einem erfolgreichen Rekombinationsereignis ein komplettes *lacZ*-Gen, das aktive β-Galactosidase codiert, was ein Screening nach blauen, rekombinanten Plaques ermöglicht, wenn dem Medium X-Gal zugesetzt wurde.

2.7.1 Transfektion und Virusgewinnung

Für die Transfektion wurden 2×10^6 Sf-9 Zellen in einer 60 mm Schale ausgesät und mit jeweils 4 µg der Konstrukte VP22-IκBα, VP22-Δ_NIκBα, VP22 und IκBα, die in pBlueBacHis2A einkloniert wurden (s. 2.2), zusammen mit 0,5 µg linearisierter Bac-N-Blue™ DNA gemäß dem Invitrogen-Protokoll unter Verwendung von Insectin-Plus™ Liposomen (Invitrogen) cotransfiziert. 2-3 Tage nach der Transfektion zeigten die Zellen erste Anzeichen einer baculoviralen Infektion, die sich in vergrößertem Zellumfang, dem Erscheinen von kristallin aussehenden viralen Körperchen (*occlusion bodies*) und dem Ablösen der Zellen von der Schale manifestierten. Nach 4 Tagen wurde der virushaltige

Überstand (2 ml) abgenommen und bei 4°C gelagert. Zum Nachweis der Produktion von rekombinanten Baculoviren wurden die Zellen direkt anschließend mit X-Gal behandelt. Dazu wurden sie für 15 min bei RT mit PBS/0,05% Glutaraldehyd fixiert, mit PBS gewaschen und schließlich mit PBS/20 mM $K_4Fe(CN)_6$ /20 mM $K_3Fe(CN)_6$ /2 mM $MgCl_2$ /1 mg/ml X-Gal überschichtet. Nach einer Stunde Inkubation bei 37°C konnte man eine intensive Blaufärbung bei etwa 2-10% der Zellen beobachten.

Da der Virustiter des abgenommenen Überstands niedrig ist, empfiehlt es sich, vor dem Plaque-Assay zur Isolierung von reinem rekombinanten Virus eine zweite Infektionsrunde durchzuführen. 2×10^6 Sf-9 Zellen wurden in einer 60 mm Schale in 1,5 ml Medium mit 300 µl Überstand infiziert. Nach 3 Tagen wurde der neue Überstand abgenommen und bis zum Plaque-Assay bei 4°C aufbewahrt. Wurden die Zellen wie oben beschrieben mit X-Gal behandelt, so färbten sich nach der zweiten Infektionsrunde 50-60% der Zellen blau.

2.7.2 Isolierung von reinen, rekombinanten Baculoviren

Während der Produktion der rekombinanten Baculoviren nach Transfektion und Rekombination entsteht auch ein gewisser Anteil an Wildtyp-Virus, was auf einen immer vorhandenen „Hintergrund“ an ungeschnittener Bac-N-BlueTM-DNA zurückzuführen ist. Dies hat zur Folge, dass über die Zeit in den abgenommenen Überständen der Titer der rekombinanten Viren zugunsten von Wildtyp-Viren schnell abnimmt. Deswegen ist es notwendig, reine rekombinante Viren mittels eines Plaque-Assays zu isolieren. Dazu wurden in 10 mm Platten 5×10^6 Zellen ausgesät und mit jeweils einem Milliliter einer 10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4} oder 10^{-5} Verdünnung des Überstands der zweiten Infektionsrunde in einem Gesamtvolumen von 3 ml infiziert. Es wurden jeweils 4 Platten pro Verdünnung infiziert. Nach einer Stunde Inkubation bei RT wurden die 3 ml Überstand abgesaugt. 5 ml einer auf 47°C erwärmten 1/1 Mischung aus 2,5%iger Baculovirus Agarose (Invitrogen) und 1,3x SF-900 Medium (Life Technologies) wurde mit 5 ml 1,3 x SF-900 Medium/10% FCS/Pen/Strep/150 µg/ml X-Gal versetzt und mit dieser Mischung wurden die Zellen vorsichtig überschichtet. Nachdem die Agarose ausgehärtet war, wurden die Platten mit Parafilm umwickelt und bei 27°C inkubiert. Nach 4-5 Tagen wurden blaue Plaques von rekombinanten Viren sowie 1-2 weiße Plaques von Wildtyp-Viren gepickt und dazu verwendet, jeweils 5×10^5 Sf-9 Zellen in 2,5 ml Medium, die in 12-well Mikrotiterplatten ausgesät worden waren, zu infizieren. Nach 3 Tagen wurden die Zellen vorsichtig abgelöst und ein Aliquot von 0,75 ml der Zellsuspension abgenommen. Der Rest der Zellen verblieb für weitere 4-5 Tage in den Platten, bis sie vollständig durch die freigesetzten Viren lysiert waren. Die Zellbruchstücke wurden abzentrifugiert und der klare virushaltige Überstand bei 4°C gelagert.

Aus dem abgenommenen 0,75 ml Aliquot wurde Virus-DNA isoliert, um mittels PCR zu verifizieren, dass die gepickten rekombinanten Virus-Plaques wirklich frei von Wildtyp-Viren waren. Die Zellsuspension wurde bei 5000 rpm für 3 min (Biofuge fresco, Heraeus) zur Entfernung von Zellen und Zellbruchstücken zentrifugiert, der klare Überstand mit 0,75 ml eiskaltem 20% Polyethylenglykol in 1 M NaCl gemischt und für 30 min auf Eis inkubiert.

Dann wurden die Viruspartikel durch Zentrifugation bei 13000 rpm, 4°C für 10 min pelletiert und in 100 µl sterilem ddH₂O resuspendiert. Es wurden 10 µl Proteinase K (10 mg/ml) zugegeben und für eine Stunde bei 50°C inkubiert. Nach einer Phenol-Chloroformextraktion wurde die Virus-DNA nach Zugabe von Natriumacetat (0,3 M) und Glycogen (5 mg/ml) mit 100% Ethanol gefällt und nach einmaligem Waschen mit 70% Ethanol in 10 µl ddH₂O resuspendiert. 5 µl davon wurden zur PCR eingesetzt. Die verwendeten Primer (5': 5'-TTTACTGTTTTTCGTAACAGTTTTG-3'; 3':5'-CAACAACGCACAGAATCTAGC-3') flankieren das Polyhedrin-Gen, das in rekombinanter Virus-DNA herausgeschnitten, in Wildtyp-Viren jedoch vorhanden ist. Die PCR-Reaktion wurde nach den im Invitrogen-Protokoll angegebenen Bedingungen durchgeführt und anschließend auf einem 1% Agarose-Gel analysiert. Ist Wildtyp-Virus-DNA vorhanden, so erhält man eine Bande bei 839 bp, während rekombinante Virus-DNA eine Bande liefert, die der Größe des inklonierten Gens + 338 bp entspricht.

Mit den Überständen, die reine rekombinante Baculoviren enthielten (P1 Stocks), wurden zwei weitere Infektionsrunden durchgeführt, um schließlich einen Stock mit hohem Virustiter zu erhalten (P3 Stock), mit dem Sf-9 Zellen für die Proteinexpression infiziert wurden.

2.8 Baculovirale Expression und Aufreinigung von Proteinen

Der Virustiter der P3-Stocks wurde über einen Plaque-Assay, der wie unter 2.7.2 beschrieben durchgeführt wurde, bestimmt. Hierbei kamen 10⁻⁶ und 10⁻⁷ Verdünnungen der P3-Stocks zur Anwendung. Als Maß für den Virustiter wurde bei der Auswertung der Assays der [pfu/ml]-Wert (pfu: *plaque forming units*) bestimmt, der sich aus folgender Formel ergibt:

$$\text{pfu/ml} = \text{Anzahl der Plaques} \times 1/\text{Verdünnung}$$

Mit Kenntnis des [pfu/ml]-Wertes ließ sich ermitteln, wieviel ml des P3-Stocks man zu einer bestimmten Zellzahl zugeben musste, um einen definierten MOI-Wert (MOI: *multiplicity of infection*) zu erhalten:

$$\text{ml, die vom P3-Stock eingesetzt werden} = \{\text{MOI (pfu/cell)} \times \text{Zellzahl}\} / \text{Virustiter (pfu/ml)}$$

Der MOI-Wert ist anschaulich die Anzahl der Viren, die auf eine Zelle entfallen. Für die Expression der rekombinanten Proteine wurde zur Infektion der Sf-9 Zellen soviel des P3-Stocks eingesetzt, bis ein MOI-Wert von 10 pfu/cell erzielt wurde.

Die Expression der Konstrukte wurde zunächst in kleinem Maßstab in Sf-9 Zellen, die in 35 mm Schalen ausgesät wurden, getestet. Nachdem mittels Western-Blot (s. 2.16) die Expression der Konstrukte verifiziert und die optimale Expressionsdauer bestimmt worden war, wurden für die Aufreinigung der Proteine Sf-9 Zellen in großem Maßstab infiziert. Dazu wurden 2 x 10⁷ Sf-9 Zellen in 175 cm² Flaschen ausgesät und mit einem MOI-Wert von 10 pfu/cell infiziert. Nach 72 h wurden die Zellen geerntet, bei 1000 rpm, 5 min, RT

(Heraeus, Omnifuge 2.0 RS) pelletiert, einmal mit eiskaltem PBS gewaschen, erneut pelletiert und schließlich bis zur Aufreinigung bei -80°C eingefroren. Für eine Aufreinigung wurden Sf-9 Zellen eingesetzt, die aus 30 175 cm² Flaschen gewonnen wurden.

VP22-I κ B α , VP22 und I κ B α

Die Sf-9 Zellpellets wurden in 60 ml eiskaltem TOTEX-Puffer („*total cell extract*“, 20 mM HEPES, pH 7,9, 350 mM NaCl, 1 mM MgCl₂, 0,5 mM EDTA, 0,1 mM EGTA, 20 % (v/v) Glycerol, 1 % (v/v) NP-40, 1 mM DTT, 2 mM PMSF, je 3 $\mu\text{g/ml}$ Aprotinin, Leupeptin und Pepstatin A) lysiert. Membranbruchstücke wurden in einem SS34 Rotor für 30 min bei 15000 rpm und 4°C abzentrifugiert. Der klare Überstand wurde mit 120 ml Verdünnungspuffer (20 mM Tris-HCl, pH 7,7, 5% (v/v) Glycerol, 5 mM β -Mercaptoethanol, je 3 $\mu\text{g/ml}$ Aprotinin, Leupeptin und Pepstatin A) auf 180 ml gebracht und mit 16 ml Q-Sepharose Fast Flow (Amersham Pharmacia) für 1 h bei 4°C auf einem Schüttler inkubiert. Anschließend wurde mit insgesamt 80 ml 50 mM NaH₂PO₄, pH 7,7, 140 mM NaCl, 10% (v/v) Glycerol, 5 mM β -Mercaptoethanol gewaschen und die gebundenen Proteine mit 40 ml 50 mM NaH₂PO₄, pH 7,0, 500 mM NaCl, 10% (v/v) Glycerol, 5 mM β -Mercaptoethanol, je 3 $\mu\text{g/ml}$ Aprotinin, Leupeptin und Pepstatin A eluiert. Nach Zugabe von Imidazol zu einer finalen Konzentration von 10 mM und der Einstellung des pH-Wertes auf 8,0 wurde das Eluat mit 4 ml Ni-NTA-Agarose (Invitrogen) für 1 h bei 4°C auf einem Schüttler inkubiert und die Mischung dann in eine leere Econo-Pac-Säule (Biorad, München) pipettiert. Die Säule wurde mit 20 ml 50 mM NaH₂PO₄, pH 8,0, 500 mM NaCl, 20 mM Imidazol, 10% (v/v) Glycerol, 5 mM β -Mercaptoethanol gewaschen. Die Proteine wurden mit 2x 2,5 ml Elutionspuffer (50 mM NaH₂PO₄, pH 8,0, 500 mM NaCl, 10% (v/v) Glycerol, 5 mM β -Mercaptoethanol) + 80 mM Imidazol, 2x 2,5 ml Elutionspuffer + 120 mM Imidazol sowie 2x 2,5 ml Elutionspuffer + 200 mM Imidazol eluiert. Alle drei Proteine befanden sich in den beiden Elutionsfraktionen mit 120 mM Imidazol sowie in der 1. Fraktion mit 200 mM Imidazol. Diese Eluate wurden vereinigt und über Nacht gegen Mono-Q-Startpuffer (50 mM Tris-HCl, pH 8,0, 150 mM NaCl, 10% (v/v) Glycerol, 5 mM β -Mercaptoethanol) dialysiert. Das Dialysat wurde mit einer Flussrate von 1 ml/min auf eine 1 ml, mit Startpuffer äquilibrierte Mono-Q-Säule (Amersham Pharmacia) aufgetragen und die Säule anschließend mit 30 ml Startpuffer gewaschen. Eluiert wurde mit einem linearen Gradienten von 30 ml ausgehend vom Startpuffer zum Mono-Q-Elutionspuffer (50 mM Tris-HCl, pH 7,2, 500 mM NaCl, 10% (v/v) Glycerol, 5 mM β -Mercaptoethanol). Es wurden 1 ml Fraktionen gesammelt. Die Fraktionen, die die Proteine in gewünschter Konzentration enthielten (alle drei Proteine eluierten ab einer NaCl-Konzentration von etwa 400 mM), wurden vereinigt. Nach Bestimmung der Proteinkonzentration wurden die vereinigten Eluate aliquotiert, in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei -80°C gelagert.

VP22

Die Lyse der Sf-9 Zellen wurde wie oben beschrieben durchgeführt. Die 60 ml des klaren Lysates wurden mit 120 ml 20 mM NaH₂PO₄, pH 7,0, 5% (v/v) Glycerol, 5 mM β-Mercaptoethanol, je 3 µg/ml Aprotinin, Leupeptin und Pepstatin A auf 180 ml verdünnt. Nach Einstellung des pH-Wertes auf 7,0 wurde die Verdünnung mit 16 ml SP-Sepharose Fast Flow (Amersham Pharmacia) für 1 h bei 4°C auf einem Schüttler inkubiert. Die SP-Sepharose wurde mit 80 ml 50 mM NaH₂PO₄, pH 7,0, 140 mM NaCl, 10% (v/v) Glycerol, 5 mM β-Mercaptoethanol gewaschen und die gebundenen Proteine mit 40 ml 50 mM NaH₂PO₄, pH 8,0, 500 mM NaCl, 10% (v/v) Glycerol, 5 mM β-Mercaptoethanol, je 3 µg/ml Aprotinin, Leupeptin und Pepstatin A eluiert. Nach Zugabe von Imidazol zu einer Endkonzentration von 10 mM wurde das Eluat über Ni-Agarose wie für VP22-IκBα und IκBα angegeben aufgereinigt. Die Elutionsfraktionen der Ni-Agarose wurden vereinigt und über Nacht gegen Mono-S-Startpuffer (50 mM NaH₂PO₄, pH 7,0, 150 mM NaCl, 10% (v/v) Glycerol, 5 mM β-Mercaptoethanol) dialysiert. Das Dialysat wurde mit einer Flussrate von 1 ml/min auf eine 1 ml, mit Startpuffer äquilibrierte Mono-S-Säule (Amersham Pharmacia) aufgetragen. Die Säule wurde mit 30 ml Startpuffer gewaschen und die Proteine anschließend mit einem linearen Gradienten von 30 ml, ausgehend vom Startpuffer zum Mono-S-Elutionspuffer (50 mM NaH₂PO₄, pH 7,8, 500 mM NaCl, 10% (v/v) Glycerol, 5 mM β-Mercaptoethanol), eluiert. Die gesammelten 1 ml Fraktionen, die VP22 in gewünschter Konzentration enthielten (VP22 eluierte ab einer NaCl Konzentration von etwa 350 mM), wurden vereinigt. Nach Bestimmung der Proteinkonzentration wurden die vereinigten Eluate aliquotiert, in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei –80°C gelagert.

2.9 Zellkultur und Kryokonservierung eukaryontischer Zellen

Falls nicht anders angegeben, wurden alle Zelllinien in RPMI-1640 Medium, das mit 10% hitzeinaktiviertem FCS, 100 U/ml Penicillin und 0,1 mg/ml Streptomycin (alles von Life Technologies) supplementiert wurde, kultiviert. Die Zellen wuchsen bei 37°C mit 5% CO₂ in wasserdampfgesättigter Atmosphäre und wurden in einer logarithmischen Wachstumsphase gehalten.

Zur Kryokonservierung wurden 20-30 x 10⁶ Zellen pelletiert, in 1,5 ml eiskaltem Einfriermedium (Kulturmedium, 20% FCS, 10% DMSO) resuspendiert und in ein Kryoröhrchen überführt. Die Zellen wurden bei –20°C für 2 h eingefroren, über Nacht bei –80°C aufbewahrt und anschließend in flüssigem Stickstoff gelagert.

Kryokonservierte Zellen wurden in Kultur genommen, indem die Zellsuspension im Kryoröhrchen in einem 37°C Wasserbad bis zum Verbleib eines kleinen Eiskristalles aufgetaut wurde. Die Zellsuspension wurde dann in ein 15 ml Falconröhrchen pipettiert, in dem 10 ml Kulturmedium vorgelegt worden waren. Die Zellen wurden pelletiert, in 5 ml Kulturmedium resuspendiert und in eine 75 cm² Kulturflasche überführt, in der 10 ml

Kulturmedium vorgelegt worden waren. Danach wurden die Zellen wie oben beschrieben kultiviert.

2.10 Import von VP22-Fusionsproteinen

Zellen wurden am Tag vor dem Importassay in 35 mm Kulturschalen ausgesät, so dass sie vor Zugabe der rekombinanten VP22-Fusionsproteine eine Konfluenz von 60-70% aufwiesen. Das Kulturmedium wurde durch 1 ml frisches Medium mit 10% FCS und Antibiotika ersetzt. Die bakteriell oder baculoviral exprimierten und aufgereinigten Proteine wurden direkt in das neue Medium verabreicht und die Zellen mit den Proteinen für 15-30 min bei 37°C inkubiert. Sollten die Zellen zusätzlich mit TNF α stimuliert werden, so wurde TNF α direkt, ohne das Medium zu wechseln, zu einer finalen Konzentration von 20 ng/ml zugegeben und die Zellen wurden weitere 15-30 min bei 37°C inkubiert. Anschließend wurde das Medium abgesaugt und die Zellen 1x mit 1,5 ml Kulturmedium + 10% FCS gewaschen. Die Zellen wurden in Medium auf Eis durch Abschaben geerntet und noch insgesamt 3x mit eiskaltem FCS supplementiertem Medium sowie abschließend 1x mit eiskaltem PBS gewaschen.

2.11 Import von I κ B α durch das Importpeptid Pep-1

Entsprechende unter 3.3 angegebene Mengen des Importpeptids Pep-1 (Stammlösung: 2 mg/ml in ddH₂O) wurden mit ddH₂O oder 60% DMSO auf 200 μ l verdünnt und mit 10 μ g bakteriell exprimiertem und aufgereinigtem I κ B α mit N-terminalem (His)₆-Epitop, das in 200 μ l PBS verdünnt worden war, gemischt. Zur Ausbildung der I κ B α /Pep-1-Komplexe wurde die Mischung für 30 min bei RT inkubiert. Zellen, die in einer 35 mm Kulturschale ausgesät worden waren, wurden dann vorsichtig mit der Mischung überschichtet, nachdem das Medium abgesaugt worden war. Nach Zugabe von 800 μ l serumfreiem Medium wurden die Zellen für 1 h bei 37°C inkubiert. Ohne den I κ B α /Pep-1-Komplex abzunehmen, wurden danach 1,5 ml Kulturmedium + 10% FCS hinzupipettiert und die Zellen für weitere 2 h bei 37°C belassen. Die Zellen wurden durch Trypsinierung geerntet und nach intensivem Waschen mit eiskaltem FCS-haltigem Medium und PBS wie unter 2.13 beschrieben lysiert.

2.12 Gewinnung von cytosolischen und Zellkernextrakten

Die geernteten und gewaschenen Zellen wurden in 100 μ l hypotonischem Lysepuffer (Puffer A: 10 mM HEPES, pH 7,9, 10 mM KCl, 0,1 mM EDTA, 0,1 mM EGTA, 1 mM DTT, 2 mM PMSF, je 3 μ g/ml Aprotinin, Leupeptin und Pepstatin A) resuspendiert. Nach 20 min Inkubation auf Eis wurden die geschwollenen Zellen lysiert, indem sie mit einer Insulinspritze 5x durch eine 22 G-Kanüle gesaugt wurden. Die Zellkerne wurden durch Zentrifugation bei 7000 rpm, 4°C für 2 min (Biofuge fresco, Heraeus) sedimentiert, der Überstand erneut

zentrifugiert (13000 rpm, 4°C, 20 min) und das nun klare cytosolische Extrakt bei –80°C aufbewahrt. Das Zellkernpellet wurde in 40 µl Hochsalzpuffer (Puffer C: 20 mM HEPES, pH 7,9, 400 mM NaCl, 1 mM EDTA, 1 mM EGTA, 1 mM DTT, 2 mM PMSF, je 3 µg/ml Aprotinin, Leupeptin und Pepstatin A) aufgenommen und anschließend intensiv für 30 min bei 4°C gevortext. Nach Zentrifugation bei 13000 rpm, 4°C für 20 min wurde der klare Überstand (Zellkernextrakt) bei –80°C eingefroren. Der Proteingehalt der cytosolischen und der Zellkernextrakte wurde nach der Methode von Bradford (1976) bestimmt.

2.13 Gewinnung von Ganz-Zellextrakten

Für die Gewinnung von Ganz-Zellextrakten (cytosolisches und Zellkernextrakt) wurden die Zellen einer 35 mm Kulturschale nach Ernte und Waschen in 60 µl TOTEX-Puffer („*total cell extract*“, 20 mM HEPES, pH 7,9, 350 mM NaCl, 1 mM MgCl₂, 0,5 mM EDTA, 0,1 mM EGTA, 20% (v/v) Glycerol, 1% (v/v) NP-40, 1 mM DTT, 2 mM PMSF, je 3 µg/ml Aprotinin, Leupeptin und Pepstatin A) für 10 min auf Eis lysiert. Membranbruchstücke wurden bei 13000 rpm, 4°C für 20 min abzentrifugiert (Biofuge fresco, Heraeus) und der klare Überstand nach Bestimmung des Proteingehalts (Bradford, 1976) bei –80°C aufbewahrt.

2.14 Lysattest

293 Zellen wurden in DMEM Medium (Life Technologies), supplementiert mit 10% FCS und Antibiotika, in drei 35 mm Kulturschalen ausgesät. Am nächsten Tag wurden die Zellen mit jeweils 2 µg DNA der Expressionskonstrukte pro 35 mm Kulturschale transfiziert. Die Transfektionen wurden mit Lipofectamin PLUS (Invitrogen) entsprechend der Anleitung des Herstellers durchgeführt. 48 h nach der Transfektion wurden die Zellen geerntet, vereinigt und wie unter 2.12 beschrieben mit insgesamt 350 µl hypotonem Lysepuffer lysiert. Dann wurden gemäß dem unter 2.12 aufgeführten Protokoll die verbleibenden Zellkerne mit 150 µl Hochsalzpuffer extrahiert. Die klaren Lysate wurden vereinigt, mit 500 µl Kulturmedium + 10% FCS gemischt und zu Zellen gegeben, die in einer 35 mm Kulturschale ausgesät worden waren. Nach 15 min Inkubation bei 37°C wurde die Lysat/Medium-Mischung abgesaugt und die Zellen wie unter 2.10 beschrieben geerntet.

2.15 EMSA (electrophoretic mobility shift assay, Gelshift)

Die DNA-Sonde mit dem NF-κB Erkennungsmotiv wurde mittels der T4-Polynukleotid-Kinase (T4-PNK) an seinen freien 5'-Hydroxylgruppen durch [γ -³²P]ATP radioaktiv markiert (Endmarkierung). Dazu wurden 30 µCi (3000 µCi/µmol [γ -³²P]ATP (Hartmann Analytic, Braunschweig)), 2,65 pmol NF-κB-Sonde (Promega, Heidelberg) und 10 U T4-PNK (Life Technologies) in einem Gesamtvolumen von 30 µl für 30 min bei 37°C inkubiert. Zu dem

Reaktionsansatz wurden anschließend 60 µl STE-Puffer (10 mM Tris-HCl, pH 7,5, 10 mM NaCl, 1 mM EDTA, pH 8,0) zugegeben und nicht umgesetzte radioaktive Nukleotide über MicroSpin™ G25 Säulchen (Amersham Pharmacia) abgetrennt. Die Markierungseffizienz wurde mittels eines Szintillationszählers bestimmt (Modell 1409, EG&G Wallac, Turku, Finnland).

Zur Bindungsreaktion wurden 10 µg Gesamtproteinmenge von entsprechenden Ganz-Zellextrakten oder Zellkernextrakten mit 50000 cpm der markierten DNA-Sonde, 2 µg BSA, 2 µg Poly[dI-dC] (Roche, Mannheim) und 4 µl 5x Bindungspuffer (20 mM HEPES, pH 7,5, 50 mM KCl, 2,5 mM MgCl₂, 20% (w/v) Ficoll, 1 mM DTT) in einem Gesamtvolumen von 20 µl für 15 min bei RT inkubiert. Der gesamte Reaktionsansatz wurde über ein 4%iges, nichtdenaturierendes Polyacrylamid-Gel in 0,5x TBE-Puffer bei 200 V, RT für 2 h aufgetrennt. Das Gel wurde anschließend auf Whatman-Papier unter Vakuum bei 70°C 2 h getrocknet, mit Zellophanfolie umwickelt und in einer Kassette mit einem Film bei -80°C für 4-24 h exponiert.

2.16 Reporterstudien

Generell wurden alle gleich zu behandelnden Messansätze als Duplikate angelegt. Zellen in einer 35 mm Kulturschale wurden mit 1 µg des Reporterplasmids 6κB, in dem das Gen der *firefly*-Luciferase unter der Kontrolle eines Promotors mit sechs NF-κB-Bindungsmotiven steht (Schmitz und Baeuerle, 1991), transfiziert. 24-40 h nach der Transfektion wurden die Zellen für 5 h mit TNFα (20 ng/ml) oder PMA (100 ng/ml) stimuliert. Die Zellen wurden nach Ernte und Waschen mit PBS in 200 µl Lysepuffer (25 mM Glycyl-Glycin, 15 mM MgSO₄, 4 mM EGTA, 1 mM DTT, 1% (v/v) Triton X-100, pH 7,8) für 10 min auf Eis lysiert. Nach Abzentrifugieren von Organellen und Membranbruchstücken wurden 50 µl des klaren Lysats zu einem *well* einer weißen 96er Platte mit flachem Boden pipettiert, in dem bereits 100 µl Reaktionspuffer (25 mM Glycyl-Glycin, 15 mM K₃PO₄, 15 mM MgSO₄, 4 mM EGTA, 1 mM DTT, 2 mM ATP, pH 7,8) vorgelegt worden waren. Die Messung wurde mit einem MicroLumat PLUS LB96V Luminometer (Berthold Technologies, Bad Wildbad) durchgeführt. Über einen Injektor wurden vom Luminometer automatisch 100 µl einer Luciferinlösung (0,3 mg/ml in ddH₂O) zu dem Reaktionsansatz gegeben und die Messzeit betrug 30 Sekunden. Die erhaltenen Messwerte wurden auf den Gesamtproteingehalt der Zelllysate normiert, der nach der Methode von Bradford (1976) bestimmt wurde.

2.17 Immunoblot (Western-Blot)

Gleiche Gesamtproteinmengen von cytosolischen, Zellkern- oder Ganz-Zellextrakten wurden mit 4x SDS-Ladepuffer (250 mM Tris-HCl, pH 6,8, 40% (v/v) Glycerol, 8,2% (w/v) SDS, 400 µg/ml Bromphenolblau, 4% (v/v) β-Mercaptoethanol) versetzt, 5 min bei 99°C inkubiert

und mittels SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE) getrennt. Je nach Größe des zu detektierenden Proteins wurden 10-15%ige SDS-Gele eingesetzt. Durch Elektroblothing bei 500 mA, 4°C für 90 min wurden die Proteine auf eine Polyvinylidendifluorid-Membran (Amersham Pharmacia) transferiert. Die Membranen wurden 1 h mit 5% (w/v) fettarmem Trockenmilchpulver in TBS (10 mM Tris-HCl, pH 7,5, 150 mM NaCl) geblockt und daraufhin für 1 h mit dem primären Antikörper inkubiert. Nach sechsmaligem Waschen mit TBS/0,05% Tween-20 wurde der entsprechende Peroxidase-gekoppelte sekundäre Antikörper für 1 h zugegeben. Die Membranen wurden dann extensiv mit TBS/0,05% Tween-20 gewaschen und die Reaktion mit verstärkter Chemilumineszenz unter Verwendung von ECL-Reagenz (Amersham Pharmacia) entwickelt.

Eingesetzte Verdünnungen der primären Antikörper (s. 2.1): anti-VP22: 1/10000; anti-I κ B α : 1/500; anti-RGSH₄-Epitop: 1/2000; anti-CMV-Epitop: 1/1000; anti-Aktin: 1/100.

Eingesetzte Verdünnungen der sekundären Antikörper (s. 2.1): Ziege-anti-Kaninchen IgG HRP-gekoppelt: 1/20000; Ziege-anti-Maus IgG HRP-gekoppelt: 1/10000.

2.18 Indirekte Immunfluoreszenz

Zellen wurden auf runden 16 mm Deckgläschen (Promochem, Wesel) kultiviert und behandelt. Nach Waschen mit PBS wurden die Zellen für 15 min bei -20°C mit eiskaltem Methanol fixiert und permeabilisiert. Nach erneutem zweimaligem Waschen mit PBS für 30 min bei RT in PBS/10% NCS (Life Technologies) geblockt. Die Inkubation mit dem primären Antikörper, verdünnt in PBS/10% NCS, erfolgte für 30 min bei RT. Die Zellen wurden zweimal 5 min in PBS und einmal kurz in PBS/10% NCS gewaschen und mit einem Fluoreszenzfarbstoff gekoppelten sekundären Antikörper für 15 min bei RT inkubiert. Anschließend wurde zweimal für 5 min mit PBS gewaschen und die Zellen in Hydromount (National Diagnostics, Atlanta, USA) auf Objektträgern eingebettet, die bei 4°C im Dunkeln aufbewahrt wurden. Mikroskopiert wurde an einem Fluoreszenzmikroskop (Nikon Eclipse TE300, SpotAdvanced Kamera und Software, Visotron Systems, Puchheim) oder an einem konfokalen Laserscanmikroskop (Olympus IX70, Fluoview Software).

Eingesetzte Verdünnungen der primären Antikörper (s. 2.1): anti-VP22: 1/1000; anti-I κ B α : 1/100; anti-RGSH₄-Epitop: 1/200; anti-CMV-Epitop: 1/100.

Eingesetzte Verdünnungen der sekundären Antikörper (s. 2.1): Ziege-anti-Maus IgG und Ziege-anti-Kaninchen IgG Rhodamin-gekoppelt: 1/200; Ziege-anti-Maus IgG und Ziege-anti-Kaninchen IgG OregonGreenTM 488-gekoppelt: 1/500.

3 Ergebnisse

3.1 Expression von IκBα und p65ΔTAD als VP22-Fusionsproteine in eukaryontischen Zellen

Wird VP22 in eukaryontischen Zellen exprimiert, so akkumuliert es zunächst im Cytoplasma der transfizierten Zellen. Nach etwa 24 h beginnt das gebildete VP22 aus diesen Zellen auszuwandern und wird von den benachbarten, nicht transfizierten Zellen aufgenommen, wo es dann im Zellkern lokalisiert ist (Elliott und O'Hare, 1997). Es wurde gezeigt, dass auch VP22-Fusionsproteine diese als *spread* bezeichnete Eigenschaft aufweisen. (Elliott und O'Hare, 1997; Phelan *et al.*, 1998; Dilber *et al.*, 1999; Elliott und O'Hare, 1999). Somit bietet VP22 die Möglichkeit, ein Protein bei suboptimaler Transfektionseffizienz in annähernd 100% der Zielzellen einzubringen (s. 1.2). Daher wurde zunächst untersucht, ob mittels dieser Strategie der Transkriptionsfaktor NF-κB effektiv inhibiert werden konnte, wenn sein Inhibitor IκBα und das NF-κB/Rel-Protein p65 ohne Transaktivierungsdomäne (p65ΔTAD) als VP22-Fusionsproteine in entsprechenden Zielzellen exprimiert wurden.

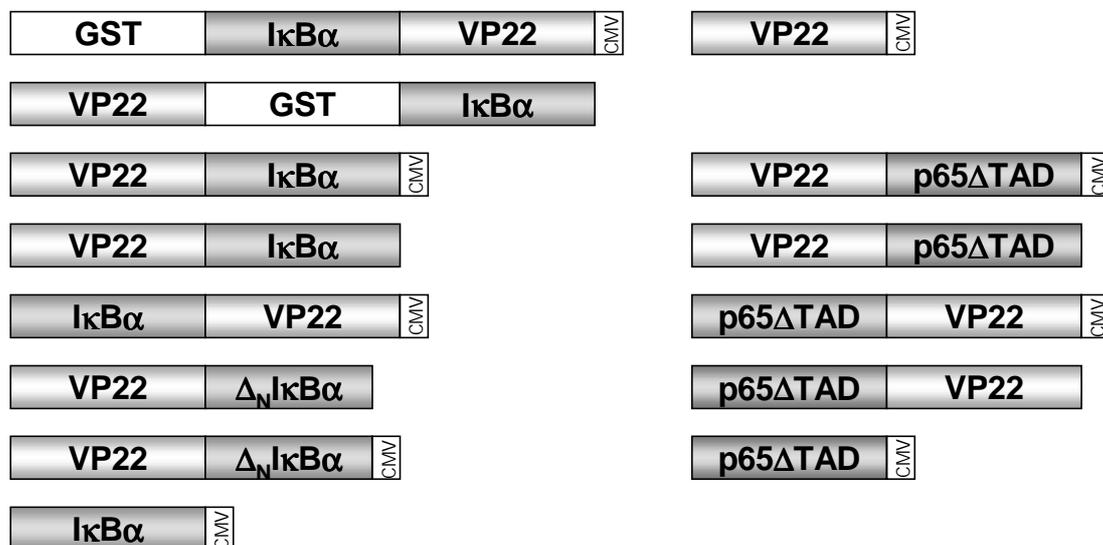


Abbildung 3: Klonierte VP22-IκBα-Konstrukte für die Expression in eukaryontischen Zellen. Alle Konstrukte wurden in den Expressionsvektor pc49ep+2 inkloniert. Die codierenden Sequenzen sind unter der Kontrolle eines CMV-Promotors. Ein C-terminales CMV-Epitop bot eine zusätzliche Möglichkeit zur Detektion der exprimierten Proteine. Eingefügtes GST sollte eine Aufreinigung oder eine Immunpräzipitation der Konstrukte erleichtern. Bei Δ_NIκBα handelt es sich um „Superrepressor“-Varianten von IκBα, bei denen die regulatorische N-terminale Domäne (AS 1-69) von IκBα weggeschnitten wurde. Diese enthält die Serin- und Lysinreste, die für die Phosphorylierung und anschließende Ubiquitinierung von IκBα notwendig sind. Δ_NIκBα kann weiterhin mit NF-κB interagieren und den Transkriptionsfaktor inhibieren, wird aber nicht mehr durch NF-κB aktivierende Stimuli abgebaut. P65ΔTAD kann mit anderen NF-κB-Untereinheiten dimerisieren und an seine Erkennungsmotive in den Promotoren seiner Zielgene binden, ist jedoch transkriptionell inaktiv und stellt somit einen potenten Inhibitor der NF-κB-Aktivität dar. IκBα-CMV, p65ΔTAD-CMV und VP22-CMV dienen als Kontrollkonstrukte.

Verschiedene VP22-I κ B α - und VP22-p65 Δ TAD-Expressionskonstrukte wurden kloniert, die in Abbildung 3 schematisch dargestellt sind. Als Ausgangsvektor diente der von pcDNA1 abgeleitete Vektor pc49ep+2 (Leslie *et al.*, 1996). Die codierenden Sequenzen stehen unter der Kontrolle eines CMV-Promotors. In zwei der I κ B α -Fusionsproteine wurde GST eingefügt, um eine Aufreinigung oder eine Immunpräzipitation zu erleichtern. Einige der Konstrukte wurden mit einem C-terminalen CMV-Epitop versehen, um eine zusätzliche Detektionsmöglichkeit zu erhalten. Bei den VP22- Δ _NI κ B α -Fusionskonstrukten wurde die regulatorische N-terminale Domäne von I κ B α (AS 1-69) weggeschnitten. Diese ist nicht für die Inhibition von NF- κ B notwendig, enthält aber die Serin- und Lysinreste, die für die Phosphorylierung und Ubiquitinierung von I κ B α verantwortlich sind (s. 1.1). Somit stellt Δ _NI κ B α einen „Superrepressor“ dar, der auch nach NF- κ B aktivierenden Stimuli nicht abgebaut wird, sondern den Transkriptionsfaktor in einem inaktiven Zustand hält. P65 Δ TAD kann mit anderen NF- κ B/Rel-Proteinen dimerisieren und an entsprechende κ B-Erkennungsmotive in der DNA binden. Durch das Fehlen der C-terminalen Transaktivierungsdomäne (AS 354-551) ist es jedoch nicht möglich, den basalen Transkriptionskomplex zu rekrutieren, was p65 Δ TAD zu einem potenten Inhibitor der NF- κ B abhängigen Transkription macht.

Analyse der Expression der VP22-I κ B α -Fusionsproteine mittels Western-Blot

Mit den klonierten VP22-I κ B α -Konstrukten wurden verschiedene Zelllinien transfiziert und ihre Expression mittels Western-Blot analysiert. Dazu wurden die Zellen 40-48 h nach der Transfektion geerntet und die Verteilung der exprimierten Proteine auf die cytosolische und die Kernfraktion der Zellen untersucht. Abbildung 4 zeigt die Detektion der VP22-I κ B α -Fusionsproteine und von Kontrollkonstrukten in HeLa Zellen. Alle VP22-I κ B α -Fusionsproteine wiesen die erwartete Größe auf und wurden sowohl durch einen anti-I κ B α als auch durch einen anti-VP22 Antikörper detektiert. Die Expressionsrate lag deutlich über der des endogen synthetisierten I κ B α (Abb. 4A, Spuren 7-10; Abb. 4C, Spuren 7-14; Abb. 4D, Spuren 5-14; endogenes I κ B α ist durch „•“ gekennzeichnet). Bei den beiden Konstrukten mit C-terminalem VP22, GST-I κ B α -VP22-CMV und I κ B α -VP22-CMV, wurden gleichermaßen mit dem anti-VP22 und dem anti-I κ B α Antikörper starke Abbauprodukte detektiert (Abb. 4A, Spuren 9 u. 10; Abb. 4C, Spuren 13 u. 14), während alle übrigen Fusionsproteine mit N-terminalem VP22 stabil waren und keine nennenswerte Fragmentierung aufwiesen. In MCF-7 und COS-1 Zellen wurde ein entsprechendes Expressionsprofil gefunden (Daten nicht gezeigt). Schaut man auf die relative Verteilung der exprimierten Proteine auf Cytosol und Zellkern, so fällt auf, dass sämtliche VP22-I κ B α -Konstrukte hauptsächlich in der cytosolischen Fraktion („c“) lokalisiert waren, während von den Kontrollproteinen (VP22, VP22-GFP und VP22-TK) ein weitaus größerer Anteil in der Zellkernfraktion („n“, *nucleus*) zu finden war.

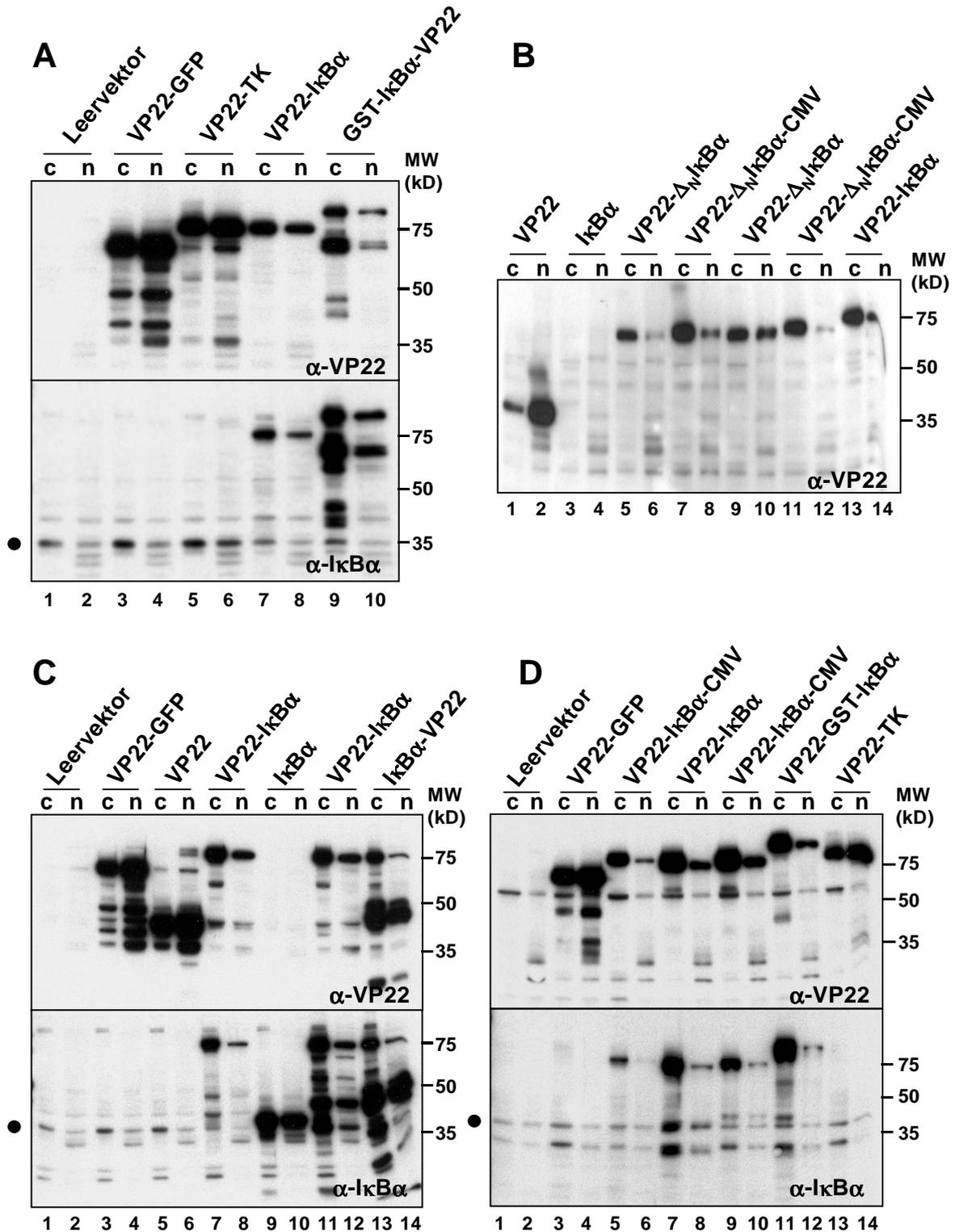


Abbildung 4: Analyse der Expression der VP22-IκBα-Konstrukte in HeLa Zellen durch Western-Blot. (A)-(D) Unterschiedliche Expressionstests in HeLa Zellen. Die Zellen wurden 40-48 h nach Transfektion mit den entsprechenden Konstrukten geerntet. Es wurden cytosolische („c“) und Kernextrakte („n“) hergestellt, von denen jeweils gleiche Gesamtproteinmengen auf die Gele aufgetragen wurden. Die exprimierten Proteine wurden mit einem anti-VP22 oder einem anti-IκBα Antikörper detektiert. Mit „●“ ist endogenes IκBα markiert. VP22-GFP: VP22-green fluorescent protein; VP22-TK: VP22-Thymidin-Kinase.

Die VP22-I κ B α -Fusionsproteine sind potente Inhibitoren der NF- κ B-Aktivierung

Nachdem die Expression der VP22-I κ B α -Fusionsproteine durch Western-Blot-Analyse bestätigt worden war, wurde untersucht, ob die hergestellten Konstrukte auch funktionell aktiv waren. Die Fähigkeit, die Aktivierung von NF- κ B zu inhibieren, wurde mittels EMSA (*electrophoretic mobility shift assay*)/Gelshift analysiert. Die Zellen wurden 40 h nach der Transfektion für 20 min oder 4 h mit TNF α , einem der stärksten Induktoren von NF- κ B, behandelt. Anschließend wurden Zellkernextrakte präpariert, die mit einem radioaktiv markierten Oligonukleotid mit NF- κ B-Erkennungsmotiv inkubiert wurden. Die Bindungsreaktionen wurden über ein nichtdenaturierendes Gel aufgetrennt. In Abbildung 5 sind die Gelshifte von entsprechend behandelten Zellkernextrakten aus HeLa Zellen dargestellt. In den Kontrollzellen, die mit Leervektor transfiziert wurden, verursachte die Behandlung mit TNF α für 20 min oder 4 h eine starke Aktivierung von NF- κ B (Abb. 5A). Expression der VP22-I κ B α - und der VP22- Δ _NI κ B α -Fusionsproteine hingegen bewirkte eine nahezu vollständige Inhibition des Transkriptionsfaktors. Weder nach 20 min noch nach 4 h Behandlung mit TNF α konnte aktiviertes NF- κ B in den jeweiligen Kernextrakten detektiert werden (Abb. 5A,B). Die Fusionskonstrukte erwiesen sich als mindestens genauso effiziente Inhibitoren wie überexprimiertes I κ B α . Dass I κ B α in Abbildung 5B nur zu einer partiellen Inhibition von NF- κ B führt, lässt sich mit einer in diesem Experiment geringeren Transfektionseffizienz erklären. Doch auch hier wird die NF- κ B-Aktivierung durch die VP22-I κ B α -Proteine effektiv blockiert. Die gleichen Ergebnisse wurden nach Expression der Konstrukte in MCF-7 Zellen erhalten (Daten nicht gezeigt). Damit wurde bestätigt, dass sowohl die N-terminalen und C-terminalen Fusionen von VP22 mit I κ B α als auch die Fusionen von VP22 mit Δ _NI κ B α und GST-I κ B α funktionell aktive Proteine lieferten. Die Inhibitionseffekte kamen nur durch die I κ B α -Proteine und nicht durch VP22 zustande, da die Expression von VP22 alleine keinen Einfluss auf die Aktivierung von NF- κ B hatte (Abb. 5B).

Die VP22-I κ B α -Fusionsproteine zeigen keine transzelluläre Migration (*spread*)

Durch Western-Blot und EMSA waren die Integrität und Funktionalität der VP22-I κ B α -Proteine gezeigt worden. Nun wurde durch indirekte Immunfluoreszenz untersucht, ob die Fusion mit VP22 die transzelluläre Migration (*spread*) und damit eine breite, extensive Verteilung der I κ B α Proteine fördert. HeLa und MCF-7 Zellen wurden 40-48 h nach Transfektion mit den Fusionskonstrukten fixiert, permeabilisiert und mit Antikörpern gegen I κ B α oder das CMV-Epitop inkubiert. Nach Färbung mit einem Fluoreszenzfarbstoff gekoppelten sekundären Antikörper wurden die Zellen mikroskopisch analysiert. Abbildung 6 zeigt beispielhaft die Expression von VP22, VP22-I κ B α -CMV und VP22- Δ _NI κ B α -CMV in MCF-7 Zellen. Nach der Detektion der Proteine durch den CMV-Epitop Antikörper wurden

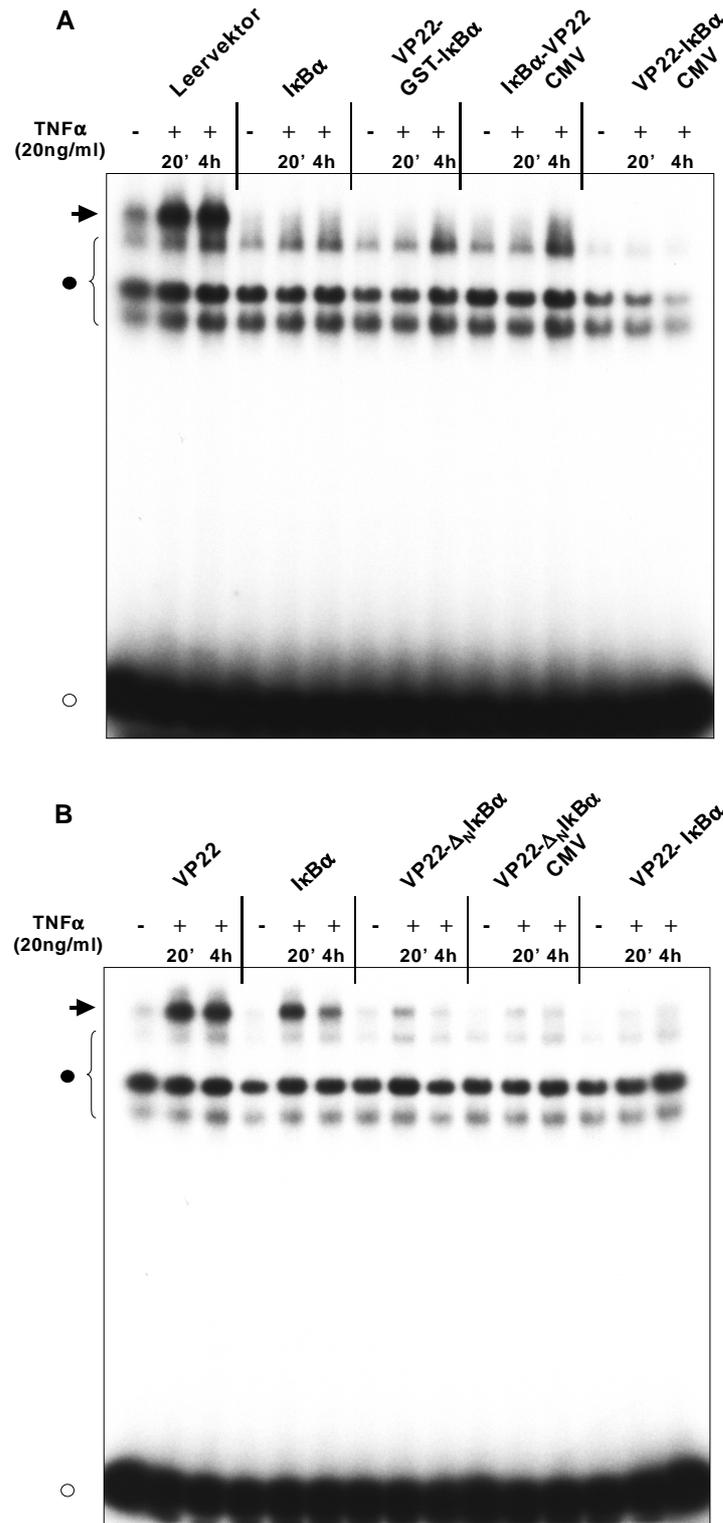


Abbildung 5: Inhibition der DNA-Bindung von aktiviertem NF- κ B durch VP22-I κ B α -Fusionsproteine. (A) und (B) zeigen zwei unterschiedliche EMSA-Experimente. HeLa Zellen wurden 40 h nach Transfektion mit den unter A und B angegebenen Konstrukten für 20 min oder 4 h mit TNF α stimuliert. Die aus den Zellen anschließend gewonnenen Kernextrakte wurden mit einem radioaktiv markierten Oligonukleotid, das ein NF- κ B-Erkennungsmotiv besitzt, inkubiert. Die Bindungsreaktionen wurden über ein nichtdenaturierendes Gel aufgetrennt. Aktiviertes NF- κ B bindet an das Oligonukleotid und der entstandene Komplex weist eine stark verminderte elektrophoretische Mobilität gegenüber dem freien Oligonukleotid („o“) auf, was zu einem „shift“ der Bande führt (markiert mit einem Pfeil). Mit „•“ sind unspezifisch auftretende Banden gekennzeichnet.

die Zellen unter einem konfokalen Laserscannmikroskop angeschaut. VP22 lieferte das charakteristische *spread*-Muster: In den transfizierten Zellen war das Protein über die gesamte Zelle verteilt mit einem starken cytoplasmatischen Anteil. In den benachbarten Zellen wurde VP22 mit etwas geringerer Fluoreszenzintensität ausschließlich im Kern detektiert, was die Folge der transzellulären Migration des Proteins aus den ursprünglich transfizierten Produzentenzellen war. Exprimiertes VP22-I κ B α -CMV und VP22- Δ _NI κ B α -CMV akkumulierten im Cytoplasma der transfizierten Zellen. Es war jedoch kein Protein in den Nachbarzellen nachzuweisen. Dies ist in Übereinstimmung mit den Western-Blot-Daten, die aufzeigten, dass sämtliche VP22-I κ B α -Proteine vorwiegend in der cytosolischen Fraktion zu finden waren, während ein beträchtlicher Anteil von VP22, VP22-TK und VP22-GFP in der Kernfraktion lokalisiert war (vermutlich aufgrund des *spreads*). Generell ließ sich in MCF-7 und HeLa Zellen weder mit dem I κ B α noch mit dem CMV-Epitop Antikörper ein *spread* der exprimierten VP22-I κ B α -Proteine beobachten (Daten nicht gezeigt).

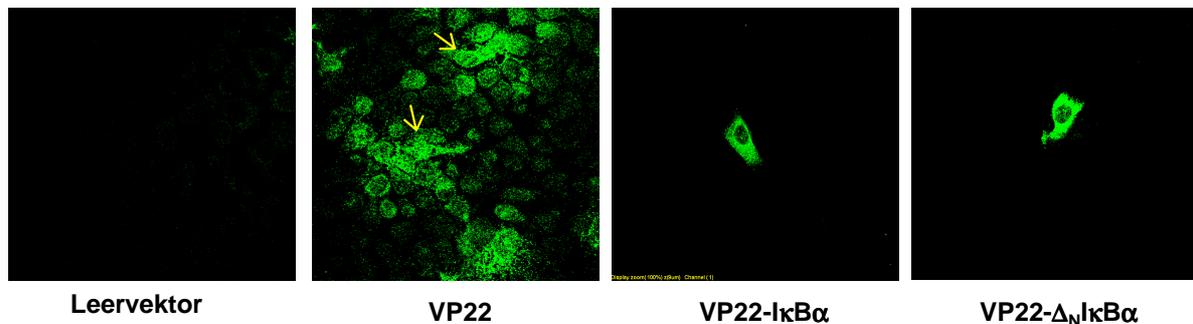


Abbildung 6: Die VP22-I κ B α -Proteine weisen keinen spread auf. MCF-7 Zellen wurden 48 h nach Transfektion mit den angegebenen Konstrukten fixiert, permeabilisiert und mit einem anti-CMV-Epitop Antikörper inkubiert. Der verwendete sekundäre Antikörper war mit OregonGreenTM 488 gekoppelt. Die Zellen wurden anschließend mit einem konfokalen Laserscannmikroskop analysiert. Exprimiertes VP22 zeigte einen charakteristischen *spread* von den transfizierten Zellen (zwei sind mit einem gelben Pfeil markiert) in die benachbarten Zellen, wo es im Zellkern lokalisiert war. VP22-I κ B α und VP22- Δ _NI κ B α wiesen keine transzelluläre Migration auf. Das exprimierte Protein verblieb im Cytoplasma der transfizierten Zellen.

Auch die VP22-p65 Δ TAD-Proteine sind funktionell aktiv, aber weisen keinen *spread* auf

Die Expression der VP22-p65 Δ TAD-Fusionsproteine wurde nach Transfektion von MCF-7 und HeLa Zellen ebenfalls mittels indirekter Immunfluoreszenz untersucht. Alle Konstrukte wurden von einem anti-p65 Antikörper erkannt (Abb. 8H-J). Die Konstrukte mit C-terminalem CMV-Epitop ließen sich auch mit einem anti-CMV-Epitop Antikörper detektieren (Abb. 8C-E). Die Aktivität der p65 Δ TAD-Proteine konnte nicht über eine Inhibition der DNA-Bindung in einem EMSA bestätigt werden, da die Proteine sehr wohl in der Lage sind, an die NF- κ B Erkennungsmotive (κ B-Stellen) zu binden. Ihr Potential, die NF- κ B abhängige Transkription zu inhibieren, wurde daher in Reporterstudien analysiert. Dazu wurden MCF-7 Zellen mit den angegebenen Konstrukten und einem Reporterplasmid, in dem die

firefly-Luciferase unter der Kontrolle eines Promotors mit 6 κ B-Stellen steht, kotransfiziert. 40 h später wurden die Zellen für 5 h mit $\text{TNF}\alpha$ behandelt und anschließend die Luciferaseaktivität in den Zellextrakten bestimmt (Abb. 7). Während die mit Leervektor und VP22 transfizierten Zellen nach $\text{TNF}\alpha$ -Stimulation eine deutlich erhöhte Luciferaseaktivität im Vergleich zu unstimulierten Kontrollzellen aufwiesen, hatte $\text{TNF}\alpha$ in den Zellen, in denen die p65 Δ TAD-Konstrukte exprimiert wurden, keinen Einfluss auf die Luciferaseaktivität. Sogar die basale Aktivität der Luciferase lag nach Expression von VP22-p65 Δ TAD und p65 Δ TAD deutlich niedriger als in Zellen, die mit Leervektor oder VP22 transfiziert worden waren (Abb. 7, weiße Säulen). Der leichte Inhibitionseffekt, der mit VP22 alleine im Vergleich zum Leervektor erzielt wurde, könnte auf die unspezifische DNA-Bindung von VP22 zurückzuführen sein, was in der schwachen Hemmung der Transkription des Reportergens resultieren könnte. Die komplette Hemmung der $\text{TNF}\alpha$ induzierten Luciferaseaktivität nach Expression der p65 Δ TAD-Proteine bestätigte jedoch, dass diese Konstrukte potent und spezifisch die NF- κ B abhängige Transkription inhibieren konnten und somit funktionell aktiv waren.

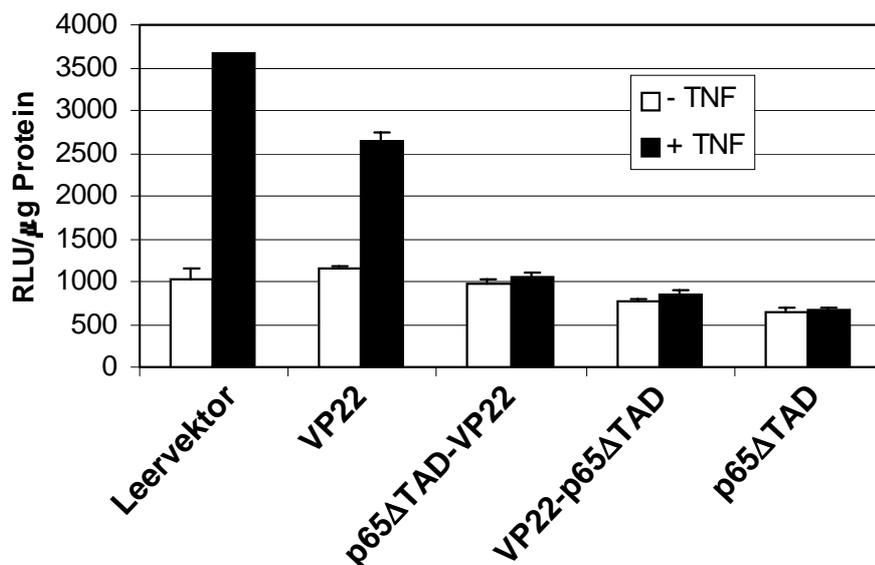


Abbildung 7: Inhibition der NF- κ B abhängigen Transkription durch die VP22-p65 Δ TAD-Konstrukte im Reportergenassay. MCF-7 Zellen wurden 40 h nach Kotransfektion mit den angegebenen Konstrukten und einem Reportergenplasmid, in dem das Gen der *firefly*-Luciferase unter der Kontrolle eines Promotors mit sechs NF- κ B-Erkennungsmotiven (6 κ B) steht, für 5 h mit $\text{TNF}\alpha$ (20 ng/ml) behandelt. Die gemessene Luciferaseaktivität (RLU; *relative light units*) wurde auf den Gesamtproteingehalt der Lysate normiert. Die Messansätze wurden als Duplikate angelegt.

Wie die VP22-I κ B α -Proteine zeigten allerdings auch die VP22-p65 Δ TAD-Proteine keinerlei Anzeichen einer transzellulären Migration (Abb. 8). Die Expression der Konstrukte lag in MCF-7 Zellen deutlich über der Expression des endogen synthetisierten p65. Im konfokalen Laserscanmikroskop wurden die exprimierten Proteine von einem anti-p65 Antikörper

erkannt bei einer Laserintensität, die so gering war, dass endogenes p65 nicht detektiert wurde (Abb. 8H-J). Erst eine Verstärkung der Intensität machte das endogene p65 sichtbar (Abb. 8F,G). Im Gegensatz zu VP22 (Abb. 8B) konnte trotz der guten Expression weder mit dem anti-CMV Antikörper (Abb. 8C-E) noch mit dem anti-p65 Antikörper (Abb. 8H-J) ein *spread* der VP22-p65 Δ TAD-Proteine nachgewiesen werden. Während die VP22-I κ B α -Proteine (Abb. 6) und ebenso das endogene p65 (Abb. 8F,G) hauptsächlich im Cytoplasma lokalisiert waren, akkumulierten die p65 Δ TAD-Proteine im Zellkern der transfizierten Zellen (Abb. 8C-E und 8H-J).

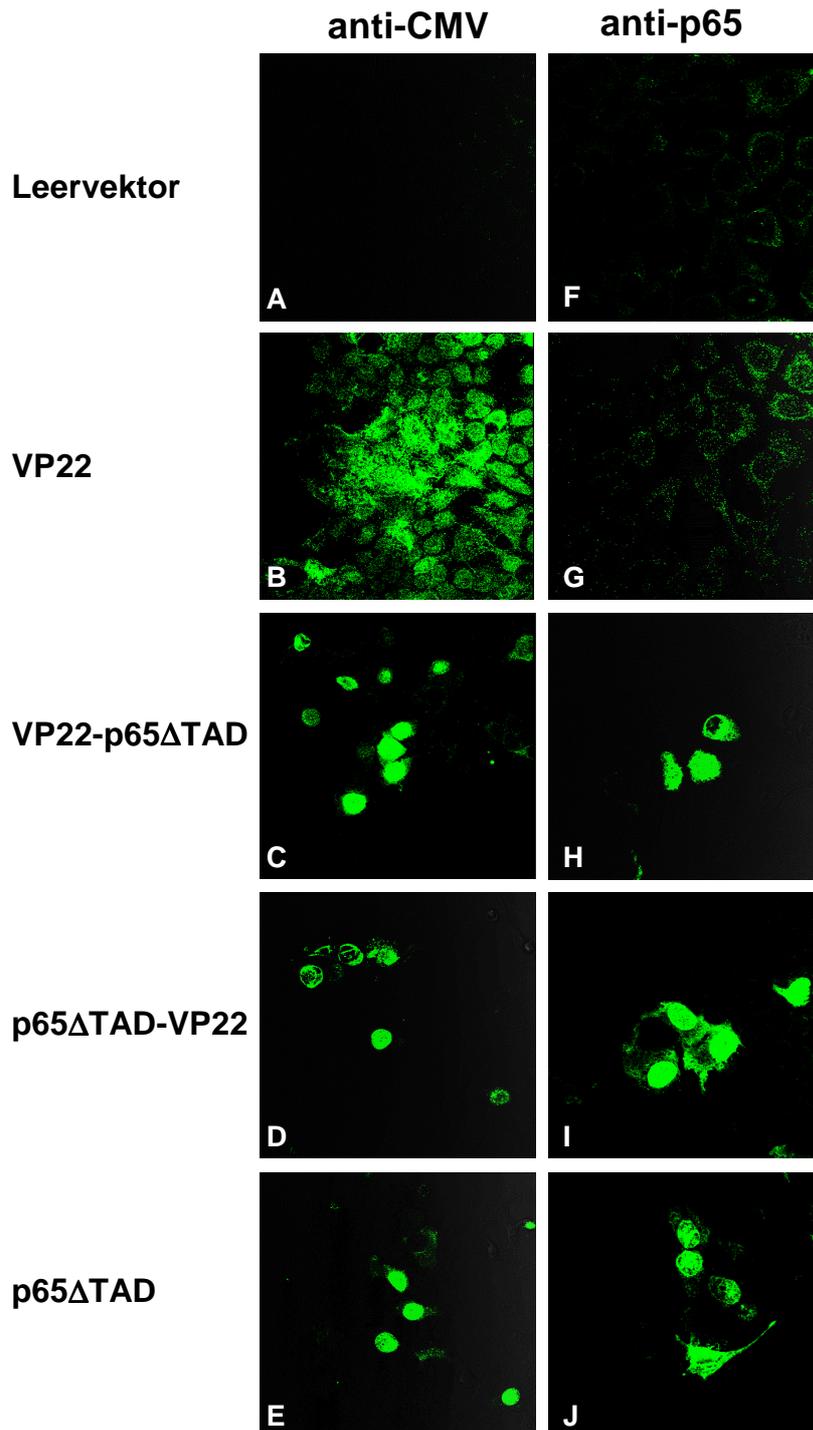


Abbildung 8: Die VP22-p65 Δ TAD-Proteine weisen keinen *spread* auf.

MCF-7 Zellen wurden 48 h nach der Transfektion mit den angegebenen Konstrukten fixiert und permeabilisiert. Die exprimierten Proteine wurden mit einem anti-CMV-Epitop (A-E) oder einem anti-p65 Antikörper (F-J) detektiert. Die verwendeten sekundären Antikörper waren mit Oregon-GreenTM 488 gekoppelt. Die Fluoreszenzaufnahmen wurden an einem konfokalen Laser-scannmikroskop gemacht. Während VP22 die charakteristische transzelluläre Migration zeigte (B), konnte für die VP22-p65 Δ TAD-Konstrukte weder mit dem anti-CMV-Epitop Antikörper (C-E) noch mit dem anti-p65 Antikörper (H-J) ein *spread* nachgewiesen werden. Die Aufnahmen in F und G wurden im Vergleich zu den Aufnahmen H-J mit leicht erhöhter Laserintensität gemacht, so dass hier auch endogenes p65 sichtbar wurde.

3.2 Expression und Import von rekombinanten VP22-I κ B α -Fusionsproteinen

Da weder die VP22-I κ B α - noch die VP22-p65 Δ TAD-Fusionsproteine eine transzelluläre Migration zeigten, war die gewählte Strategie, die Gene in die Zellen einzuschleusen und über den *spread* der exprimierten Proteine den gewünschten Effekt der NF- κ B-Inhibierung zu erreichen, ungeeignet. Als Elliott und O'Hare 1997 den *spread* von VP22 und VP22-Fusionsproteinen publizierten, wiesen sie jedoch ebenfalls nach, dass auch exogen verabreichte VP22-Fusionsproteine von Zellen effektiv aufgenommen werden. In diesen Import-Experimenten verwendeten sie rohe, ungereinigte Lysate von Zellen, in denen die entsprechenden Fusionsproteine exprimiert worden waren. Es wurde daher untersucht, ob die VP22-I κ B α - und VP22-p65 Δ TAD-Proteine über diesen Ansatz der klassischen Proteintransduktionstechnologie in Zellen eingeliefert werden können. Dabei sollten jedoch gereinigte, rekombinante Proteine zum Einsatz kommen.

3.2.1 Expression von VP22-I κ B α in *E. coli*

Zunächst wurde versucht, die VP22-I κ B α - und VP22-p65 Δ TAD-Proteine in *E. coli* zu exprimieren. Es wurden verschiedene Expressionsvektoren mit 6x Histidin- (His)₆ und GST (Glutathion-S-Transferase)-Fusionen für eine effiziente affinitätschromatographische Aufreinigung getestet. Mit keinem der verwendeten Vektorsysteme ließ sich VP22 alleine oder VP22 mit N- oder C-terminal fusioniertem I κ B α oder p65 Δ TAD zur Expression bringen. Auf Coomassie-gefärbten Gelen waren die Fusionsproteine nicht zu detektieren und eine Western-Blot-Analyse zeigte, dass das wenige produzierte Protein sofort nach Beginn der Expression fragmentiert wurde (Daten nicht gezeigt). Einzig I κ B α ohne VP22 wurde in allen getesteten Systemen gut exprimiert und war problemlos aufzureinigen (Protokolle in 2.5).

Die C-terminale Hälfte von VP22 scheint für die meisten Eigenschaften von VP22 wie Mikrotubulibindung, Chromatinbindung und transzelluläre Migration verantwortlich zu sein, wobei die 34 C-terminalen Aminosäuren (AS 268-301) absolut essentiell für den *spread* und den Import von VP22 sind (Elliott und O'Hare, 1997). Deswegen wurde getestet, ob Fusionsproteine aus I κ B α und p65 Δ TAD mit der C-terminalen Hälfte von VP22 (AS 160-301; VP22 Δ ₁₋₁₅₉) oder sogar nur mit den letzten 34 Aminosäuren von VP22 (AS 268-301; VP22 Δ ₁₋₂₆₇) eine höhere Expression und Stabilität aufweisen und ob diese Proteine Transduktionspotential besitzen. Die entsprechenden Konstrukte sind nachfolgend als 22 Δ 159 und 22 Δ 267 bezeichnet.

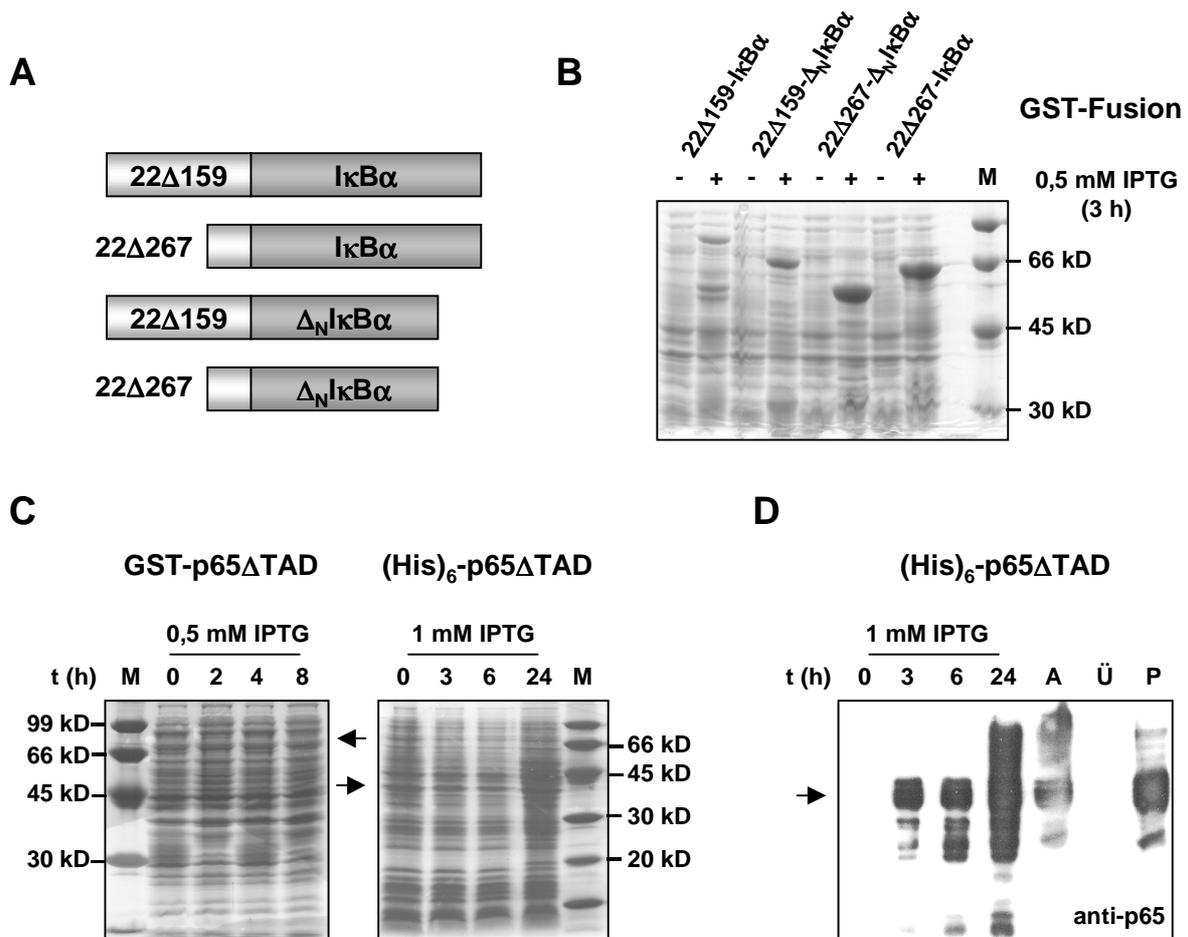


Abbildung 9: Bakterielle Expression der IκBα- und p65ΔTAD-Konstrukte. (A) IκBα und Δ_NIκBα wurden N-terminal mit VP22Δ₁₋₁₅₉ (22Δ159) und VP22Δ₁₋₂₆₇ (22Δ267) fusioniert. Die Konstrukte wurden in den Vektor pGEX-6P-2 kloniert, so dass die Proteine mit N-terminalem GST exprimiert wurden. (B) Expression der unter A dargestellten GST-Fusionen. Lysate von Bakterienkulturen vor („-“) und nach Induktion der Expression durch 0,5 mM IPTG („+“) sind nach Auftrennung über ein SDS-Polyacrylamidgel und Färbung mit *Coomassie Brilliant Blue* R250 gezeigt. M: Proteinmarker. (C) Expressionstest von GST-p65ΔTAD und (His)₆-p65ΔTAD. Zu keinem der angegebenen Zeitpunkte nach Induktion mit IPTG konnte auf *Coomassie Brilliant Blue* R250 gefärbten Gelen eine Expression nachgewiesen werden. Die Position der zu erwartenden Banden ist durch einen Pfeil markiert. M: Proteinmarker. (D) Detektion von exprimiertem (His)₆-p65ΔTAD mittels Western-Blot durch einen anti-p65 Antikörper. Die (His)₆-p65ΔTAD-Bande ist durch einen Pfeil gekennzeichnet. A: Bakterien nach 6 h IPTG-Induktion vor Aufschluss durch 1% TritonX-100, 30 min Verdau mit Lysozym (1 mg/ml) und Sonifizieren. Ü: Klarer Überstand nach Aufschluss. P: Pellet nach Zentrifugation des Aufschlusses.

22Δ159-IκBα, 22Δ267-IκBα, 22Δ159-Δ_NIκBα und 22Δ267-Δ_NIκBα fusioniert mit N-terminalem GST wiesen tatsächlich eine starke, induzierbare Expression auf (Abb. 9A,B). Alle exprimierten Proteine hatten die erwartete Größe und wurden in Coomassie-gefärbten Gelen als stark hervortretende Banden detektiert. Die Expression von 22Δ159-IκBα und 22Δ159-Δ_NIκBα war zwar stark, aber deutlich schwächer als die der entsprechenden Fusionen mit 22Δ267 (Abb. 9B). Da die Proteine mit der kompletten VP22-Sequenz gar nicht exprimiert wurden, scheint eine Korrelation zwischen Expressionsrate und Länge der

VP22-Sequenz zu bestehen. Im Gegensatz zu den I κ B α -Konstrukten wurden 22 Δ 159-p65 Δ TAD und 22 Δ 267-p65 Δ TAD nicht besser und stabiler exprimiert als VP22-p65 Δ TAD (Daten nicht gezeigt). Jedoch konnte schon von p65 Δ TAD alleine weder als GST- noch als (His) $_6$ -Fusion auf Coomassie-gefärbten Gelen eine Expression nachgewiesen werden (Abb. 9C). Nur im Western-Blot wurde das produzierte Protein sichtbar (Abb. 9D). Das wenige exprimierte Protein befand sich jedoch ausschließlich in *inclusion bodies*, wie ein Testaufschluss der Bakterien zeigte (Abb. 9D). Nach 6 h Induktion mit IPTG wurde ein Teil der Bakterien geerntet und in PBS resuspendiert („A“ in Abb. 9D). Nach dem Aufschluss durch Zugabe von 1% Triton X-100, Lysozymverdau und Sonifizieren befand sich das gesamte p65 Δ TAD in der unlöslichen Pelletfraktion („P“), während im klaren Überstand („Ü“) kein Protein detektiert werden konnte. Trotzdem wurde versucht, (His) $_6$ -p65 Δ TAD denaturierend in 8 M Harnstoff aufzureinigen, was allerdings zu geringe Mengen an Protein ergab, um genügend Material (vor allem nach vorherigem Renaturieren) für Importexperimente zu produzieren (Daten nicht gezeigt). Deshalb wurde im Folgenden das Augenmerk auf die Expression und Reinigung der I κ B α -Fusionskonstrukte gerichtet.

Die affinitätschromatographische Aufreinigung von GST-22 Δ 159-I κ B α und GST-22 Δ 159- Δ _NI κ B α über GSH-Sepharose erfordert eine Vorreinigung über Q-Sepharose

Exprimierte GST-22 Δ 267-I κ B α - und GST-22 Δ 267- Δ _NI κ B α -Proteine ließen sich nach dem Aufschluss der *E. coli* Kulturen problemlos über eine GSH-Sepharosesäule aufreinigen (Daten nicht gezeigt, Protokoll in 2.5). Wurden jedoch die klaren Überstände aus Aufschlüssen von GST-22 Δ 159-I κ B α und GST-22 Δ 159- Δ _NI κ B α produzierenden Bakterien auf die GSH-Säule aufgetragen, so wurde im Eluat stets nur fragmentiertes Protein gefunden (Abb. 10A, „E“). In Abbildung 10A ist die Reinigung von GST-22 Δ 159- Δ _NI κ B α dargestellt. Hier war der Aufschluss der Bakterien nicht optimal, da ein großer Anteil des Proteins in der unlöslichen Pelletfraktion („P“) verblieb. Das gleiche Bild der Elution von der GSH-Säule ergab sich ebenfalls bei besseren Aufschlüssen und auch mit GST-22 Δ 159-I κ B α (Daten nicht gezeigt). Es wurde daher untersucht, ob ein der GSH-Säule vorangestellter Reinigungsschritt die Bindung und vor allem die Elution der intakten Proteine ermöglichte. Eine Ammoniumsulfat-Fällung des klaren Überstandes brachte keinen Erfolg (Daten nicht gezeigt). Alternativ wurde eine Vorreinigung durch Ionenaustausch-Chromatographie getestet. 22 Δ 159-I κ B α -Proteine sind regelrechte Dipole. Bei physiologischem pH verleihen die vielen basischen Aminosäurereste von 22 Δ 159 dem N-terminalen Teil des Fusionsproteins eine starke positive Gesamtladung, während die zahlreichen Glutamat- und Aspartatreste von I κ B α eine starke negative Ladung der C-terminalen Hälfte verursachen. Deshalb wurde die Bindung an einen Kationenaustauscher (SP-Sepharose) und an einen Anionenaustauscher (Q-Sepharose) bei verschiedenen pH-Werten untersucht. Abbildung 10B zeigt, dass 22 Δ 159- Δ _NI κ B α bei diesem Test im kleinen Maßstab effektiv bei pH 6,0 an SP-Sepharose sowie bei pH 7,5 und 8,0 an Q-Sepharose binden konnte und als intaktes Protein eluiert wurde. Die

Vorreinigung über Q-Sepharose erwies sich dann auch im großen Maßstab als sehr erfolgreich (Abb. 10C). Durch Ausschütteln des klaren Lysats im Batchverfahren wurde der Hauptanteil des exprimierten GST-22Δ159-Δ_NIκBα an Q-Sepharose gebunden und eine beträchtliche Aufreinigung des Proteins erzielt (Abb. 10C, „DQ“ - „EQ“). Vor allem aber konnte das vorgereinigte GST-22Δ159-Δ_NIκBα nach Dialyse und Auftrag auf eine GSH-Sepharosesäule als intaktes Protein eluiert werden (Abb. 10C, „E1“ u. „E2“). Die Strategie wurde ebenfalls erfolgreich für GST-22Δ159-IκBα angewendet (Abb. 11C).

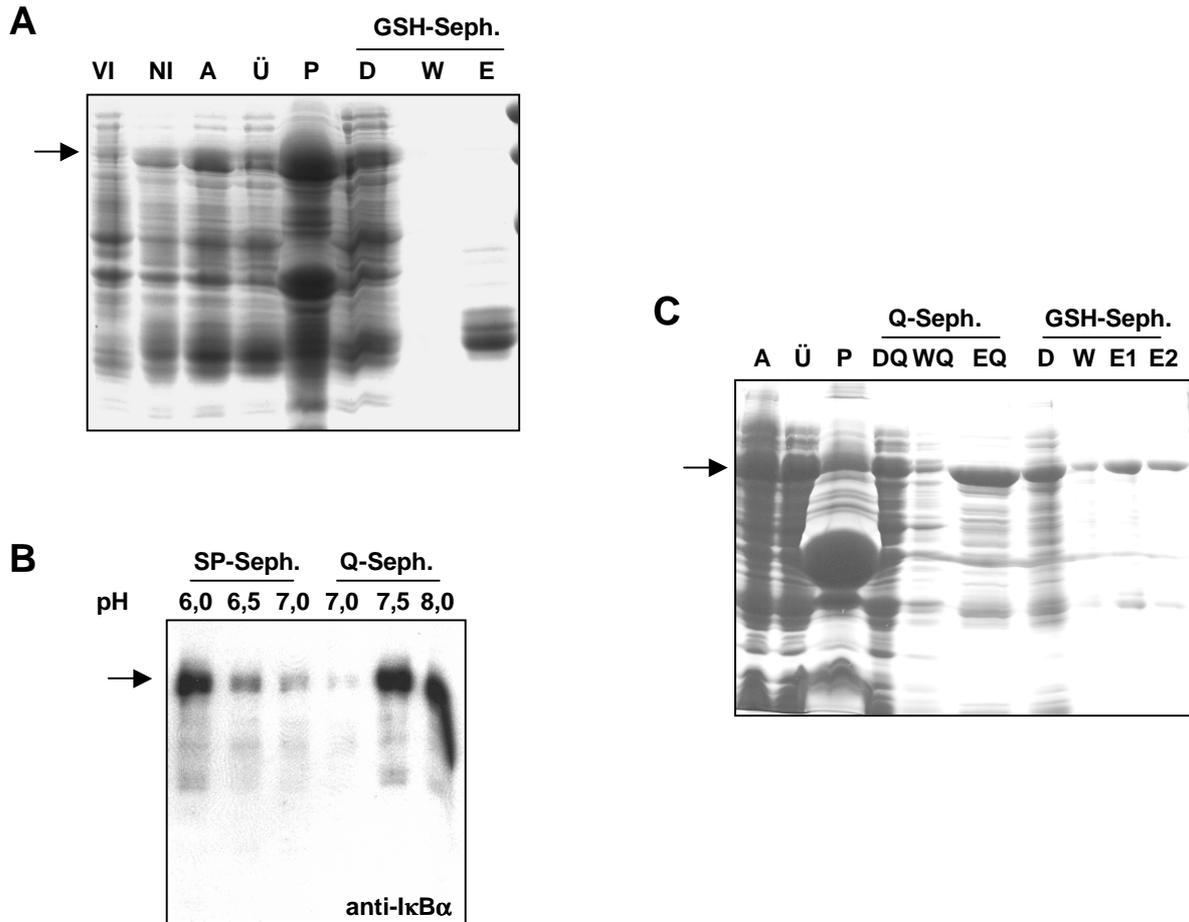


Abbildung 10: Aufreinigung von GST-22Δ159-Δ_NIκBα über GSH-Sepharose mit und ohne Vorreinigung über Q-Sepharose. GST-22Δ159-Δ_NIκBα ist jeweils mit einem Pfeil markiert. (A) Dokumentation der Expression und Reinigung des Proteins über eine GSH-Säule ohne Vorreinigung über Q-Sepharose auf einem Coomassie Brilliant Blue gefärbten SDS-Gel. VI: vor Induktion; NI: nach Induktion; A: resuspendiertes Bakterienpellet vor Aufschluss; Ü: klarer Überstand nach Aufschluss; P: Pelletfraktion nach Aufschluss; D: Durchlauf; W: Waschfraktion; E: Eluat der GSH-Sepharose-Säule. (B) Bakterien wurden nach 3 h Induktion der Expression von GST-22Δ159-Δ_NIκBα in einem Phosphatpuffer (für SP-Sepharose) oder einem Trispuffer (für Q-Sepharose) mit jeweils 20 mM NaCl bei den angegebenen pH-Werten lysiert. Die klaren Lysate wurden für 30 min bei 4°C mit SP- oder Q-Sepharose im Batchverfahren inkubiert. Nach Elution mit entsprechenden Hochsalzpuffern (750 mM NaCl) wurden die Eluate mittels Western-Blot analysiert. An die Ionenaustauscher gebundenes und eluiertes Protein wurde durch einen anti-IκBα Antikörper detektiert. (C) Dokumentation der Expression und Reinigung des Proteins über eine GSH-Säule nach Vorreinigung über Q-Sepharose auf einem Coomassie gefärbten Gel. DQ: Durchlauf; WQ: Waschfraktion; EQ: Elution von Q-Sepharose. Bei der in den Pelletfraktionen (P) auftretenden, sehr prominenten Bande handelt es sich um Lysozym.

Abspaltung und Abtrennung von GST

Für den Erhalt von 22 Δ 159-I κ B α , 22 Δ 267-I κ B α , 22 Δ 159- Δ _NI κ B α und 22 Δ 267- Δ _NI κ B α musste im nächsten Schritt GST entfernt werden. Viele der kommerziellen GST-Expressionsvektoren haben zu diesem Zweck eine Thrombin-Schnittstelle, die das Abschneiden von GST durch Thrombin-Verdau ermöglicht. Da VP22 jedoch in seiner C-terminalen Hälfte mindestens eine Thrombin-Schnittstelle besitzt, wurde zur Klonierung und Expression der Konstrukte der Vektor pGEX-6P-2 eingesetzt, der eine spezifische Schnittstelle für eine rhenovirale Protease (PreScissionTM-Protease) hat. Dabei trat allerdings das Problem auf, dass es nach Zugabe dieser Protease zum irreversiblen Ausfallen der Proteine im Verdauansatz kam (Abb. 11A). Nach 2 h Inkubation von GST-22 Δ 159- Δ _NI κ B α mit PreScissionTM-Protease befand sich fast das gesamte Protein im unlöslichen Präzipitat („P“) und nur noch wenig in Lösung („L“), obwohl der Verdau zu diesem Zeitpunkt noch nicht komplett war (Abb. 11A). Die Präzipitatabildung schien nicht auf die VP22-Sequenz zurückzuführen sein, sondern trat generell bei allen exprimierten und aufgereinigten Proteinen, die in pGEX-6P-2 kloniert wurden, auf. Nach Austesten von verschiedensten Bedingungen wurde gefunden, dass 0,01% Triton X-100 im Verdauansatz das Ausfallen zwar nicht komplett unterbinden, jedoch soweit vermindern kann, dass auch nach vollständigem Verdau (6-8 h) noch genügend Protein in Lösung war (Abb. 11B, Spur 3; Abb. 11C, „VL“). Die 22 Δ 159- und 22 Δ 267-I κ B α -Fusionsproteine konnten danach problemlos über eine Mono-Q-Säule von GST getrennt werden, das nicht an die Säule gebunden wurde, sondern sich im Durchlauf befand (Abb. 11B, Spur 4; Abb. 11C, „D“ – „E2“).

22 Δ 159- Δ _NI κ B α und 22 Δ 267- Δ _NI κ B α werden spezifisch von Zellen aufgenommen, nicht aber die entsprechenden GST-Fusionsproteine

Für die Aufnahme von reinen, rekombinanten VP22-Fusionsproteinen in Zellen waren bisher keine Reaktionsbedingungen bekannt, was z. B. die eingesetzte Proteinmenge, die Importkinetik und den Einfluss äußerer Parameter, wie etwa die Gegenwart von Serum, anging. 22 Δ 159- Δ _NI κ B α und GST-22 Δ 159- Δ _NI κ B α waren die ersten Kandidaten, die auf ihr Proteintransduktionspotential getestet wurden (Abb. 12). Jeweils 10 μ g der Proteine wurden in Vollmedium (+ 10% FCS) oder serumfreiem Medium zu MCF-7 Zellen in einer 35 mm Kulturschale gegeben. Nach 30 min wurden die Zellen geerntet und extensiv mit Vollmedium und PBS gewaschen. Die Aufnahme der Proteine wurde durch Detektion mit einem anti-I κ B α Antikörper in einem Western-Blot der hergestellten Gesamtzellextrakte analysiert (Abb. 12, linker Teil, obere Hälfte). 22 Δ 159- Δ _NI κ B α wurde sowohl in serumhaltigem wie in serumfreiem Medium effektiv in die Zellen importiert (Pfeil mit spitzem Ende). Die Konzentration des aufgenommenen Proteins war in den Zellextrakten höher als die Konzentration des endogenen I κ B α („●“). GST-22 Δ 159- Δ _NI κ B α (Pfeil mit rundem Ende) ergab eine deutlich schwächere Bande, die nach Verabreichung des Proteins in serumhaltigem

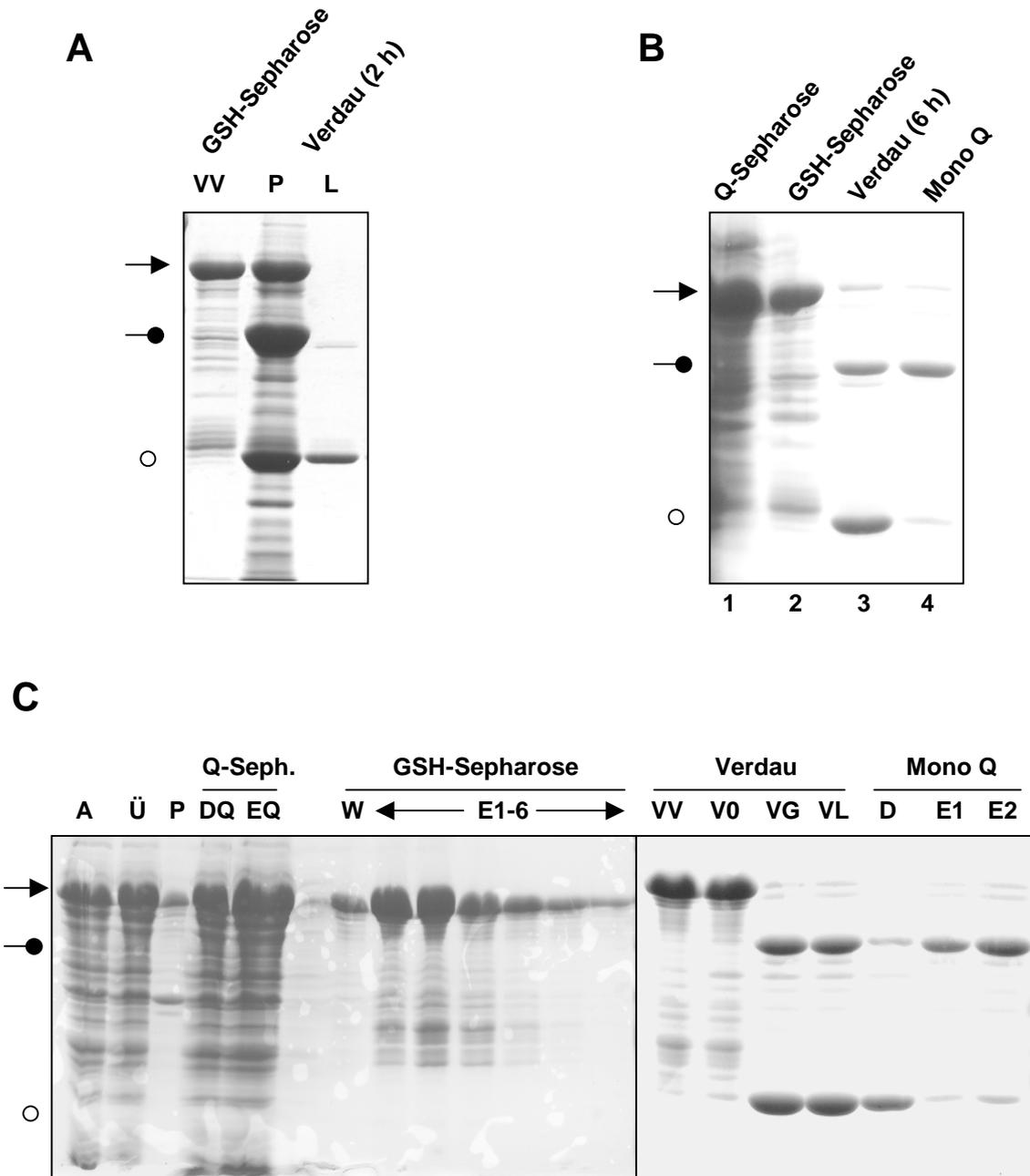


Abbildung 11: Entfernung von GST. In A-C sind die GST-Fusionsproteine durch einen Pfeil mit spitzem Ende, die Proteine ohne GST durch einen Pfeil mit rundem Ende und abgespaltenes GST durch „o“ gekennzeichnet. (A) Die Abspaltung von GST aus GST-22Δ159-ΔN-IκBα durch die PreScission™-Protease führt zum irreversiblen Ausfallen der Proteine. VV: Dialysat der Eluate von der GSH-Säule vor Zugabe der Protease; P: aufgeschlemmtes Pellet der präzipitierten Proteine nach 2 h Verdau; L: klarer Überstand nach Abtrennung der ausgefallenen Proteine. (B) Die Schritte der Aufreinigung von 22Δ159-ΔN-IκBα nach Optimierung des Proteaseverdau durch Zugabe von 0,01% Triton X-100. (C) Aufreinigung von 22Δ159-IκBα. A: resuspendiertes Bakterienpellet vor Aufschluss; Ü: klarer Überstand nach Aufschluss; P: Pellet nach Zentrifugation des Aufschlusses; DQ und EQ: Durchlauf und Eluat der Q-Sepharose; W und E1-6: Waschfraktionen und Eluate 1-6 der GSH-Sepharosesäule; VV: Dialysat der gepoolten GSH-Eluate vor Verdau; V0: Verdauansatz direkt nach Zugabe der Protease; VG: gesamter Verdauansatz nach 6 h; VL: Verdauansatz nach Abzentrifugation präzipitierter Proteine; D, E1 und E2: Durchlauf, Eluate 1 und 2 der Mono-Q-Säule.

Medium kaum noch sichtbar war. Exogen zugegebenes I κ B α -Protein besitzt die gleiche elektrophoretische Mobilität wie endogen synthetisiertes I κ B α , was zu einer Überlagerung der Banden im Western-Blot führte („•“). Trotzdem ist offensichtlich, dass es nach Inkubation in serumfreiem Medium zu einer Verstärkung der I κ B α -Bande kam, während nach Inkubation in Vollmedium hauptsächlich endogenes I κ B α in den Zellextrakten detektiert wurde. Es wurden wesentlich größere Mengen von 22 Δ 159- Δ _NI κ B α als von GST-22 Δ 159- Δ _NI κ B α oder I κ B α in den Zellextrakten gefunden. Auch die Gegenwart von Serum hatte im Gegensatz zu den beiden anderen Proteinen keinen hemmenden Einfluss auf die Detektion von 22 Δ 159- Δ _NI κ B α . Dies zeigte, dass die 22 Δ 159- Δ _NI κ B α -Banden auf spezifischen Import des Proteins zurückzuführen waren. Das Auftreten der schwachen Banden von GST-22 Δ 159- Δ _NI κ B α und exogenem I κ B α kam wahrscheinlich durch unspezifische Effekte wie die Wechselwirkung der Proteine mit der Plasmamembran zustande, die in Abwesenheit von Serum verstärkt wurden. Im Folgenden wurden daher alle Import-Experimente in Vollmedium durchgeführt.

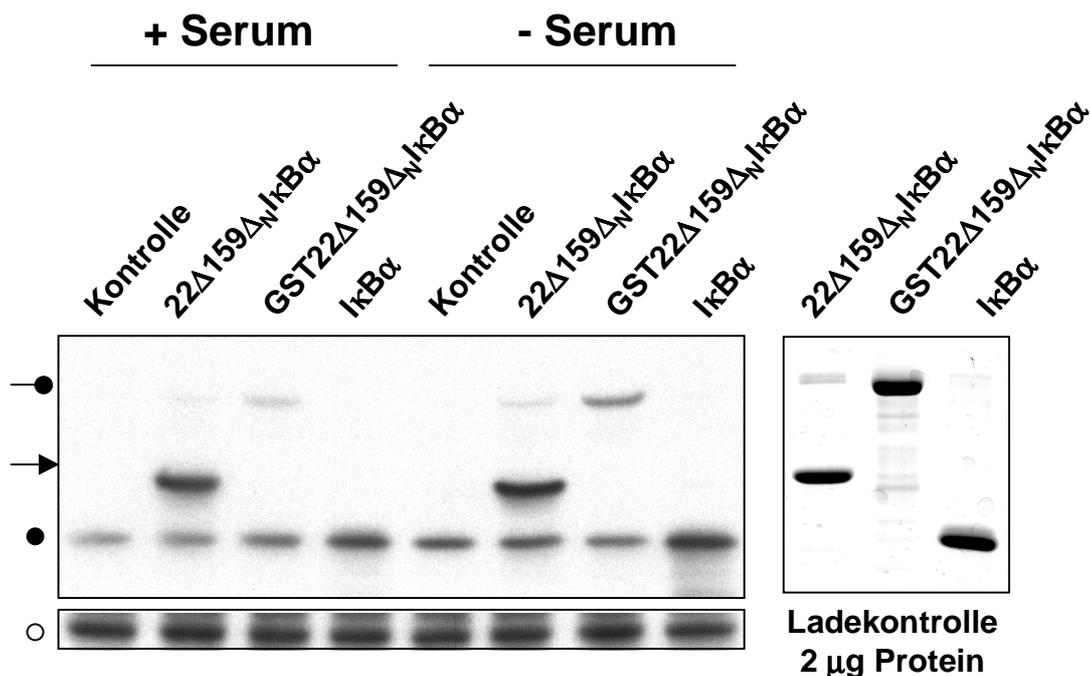


Abbildung 12: 22 Δ 159- Δ _NI κ B α wird effektiv von Zellen aufgenommen. 10 μ g von 22 Δ 159- Δ _NI κ B α , GST-22 Δ 159- Δ _NI κ B α und I κ B α wurden in 1 ml serumhaltigem oder serumfreiem Medium verdünnt und zu MCF-7 Zellen, die eine Konfluenz von 60-70 % aufwiesen, in eine 35 mm Kulturschale gegeben. Nach 30 min Inkubation bei 37°C wurden die Zellen extensiv mit Vollmedium und PBS gewaschen und Gesamtzellextrakte hergestellt. Die Aufnahme der Proteine wurde durch Detektion mit einem anti-I κ B α Antikörper in einem Western-Blot analysiert (linke Hälfte, oberer Teil). 22 Δ 159- Δ _NI κ B α ist durch einen Pfeil mit spitzem Ende, GST-22 Δ 159- Δ _NI κ B α durch einen Pfeil mit rundem Ende, exogenes und endogenes I κ B α durch „•“ markiert. Die Gabe gleicher Mengen von rekombinantem Protein zu den Zellen wurde neben einem Bradford-Assay auch über ein Coomassie Brilliant Blue R250 gefärbtes SDS-Gel bestätigt, auf das jeweils 2 μ g der aufgereinigten Proteine aufgetragen worden waren (rechte Hälfte). Mit „o“ ist die Aktin-Bande (Detektion durch einen anti-Aktin Antikörper) gekennzeichnet, die als Ladekontrolle für den Western-Blot diente.

Die Ergebnisse des ersten Assays wurden in weiteren Versuchen bestätigt (Abb. 13). Nur 22Δ159-Δ_NIκBα (Pfeil mit spitzem Ende), nicht aber GST-22Δ159-Δ_NIκBα, GST-IκBα oder IκBα, wurde spezifisch von Zellen aufgenommen (Abb. 13A). Auch 22Δ267-Δ_NIκBα (Pfeil mit rundem Ende) wurde in die Zellen importiert, jedoch in geringerem Maße als 22Δ159-Δ_NIκBα (Abb. 13A,B). Dies zeigte, dass in der Tat die letzten 34 Aminosäuren von VP22 für die Transduktion ausreichend waren, die längere VP22-Sequenz des 22Δ159-Konstruktes aber die Effektivität der Transduktion erhöhte. Wie bei 22Δ159-Δ_NIκBα konnte keine Aufnahme der GST-Fusion von 22Δ267-Δ_NIκBα beobachtet werden (Abb. 13A). Wurden die Zellen nach 30 min Inkubation mit den rekombinanten Proteinen für weitere 30 min mit TNFα behandelt, so kam es erwartungsgemäß zur IKK- und Proteasom abhängigen Degradation von endogenem IκBα („•“; Abb. 13A,B). Interessanterweise verlor auch die 22Δ267-Δ_NIκBα-Bande deutlich an Intensität, obwohl durch das Fehlen der N-terminalen regulatorischen Domäne von IκBα in diesem Konstrukt der induzierte Abbau des Proteins verhindert werden müsste. Demgegenüber wurde internalisiertes 22Δ159-Δ_NIκBα auch in Lysaten von TNFα behandelten Zellen ohne nennenswerten Verlust detektiert (Abb. 13A,B). Es wurde weiterhin die Dosisabhängigkeit der Aufnahme von 22Δ159-Δ_NIκBα und 22Δ267-Δ_NIκBα untersucht (Abb. 13B). Der intrazelluläre Gehalt des gut importierten 22Δ159-Δ_NIκBα konnte bei einer Erhöhung der Dosis des eingesetzten Proteins von 10 μg auf 40 μg auf etwa das Doppelte gesteigert werden. Die gleiche Dosiserhöhung bei dem schwächer importierten 22Δ267-Δ_NIκBα führte sogar ungefähr zu einer Vervierfachung des aufgenommenen Proteins, so dass auch mit 22Δ267-Δ_NIκBα intrazelluläre Konzentrationen erreicht werden konnten, die über der von endogen exprimiertem IκBα lagen.

22Δ159-IκBα und 22Δ159-Δ_NIκBα inhibieren NF-κB *in vitro* aber nicht *in vivo*

Nachdem die spezifische Aufnahme von 22Δ159-Δ_NIκBα und 22Δ267-Δ_NIκBα nachgewiesen worden war, wurde ihre Fähigkeit getestet, nach erfolgtem Import in die Zellen NF-κB zu inhibieren. So wurde mit den Gesamtzellextrakten des in Abbildung 13A dargestellten Experiments ein EMSA durchgeführt. IκBα sowie sämtliche GST-Fusionsproteine hatten keinen hemmenden Einfluss auf die TNFα induzierte Bindung von NF-κB an seine Konsensussequenz (Abb. 14), was in Übereinstimmung mit der Tatsache war, dass sie nicht in die Zellen eintransportiert worden waren (Abb. 13A). Doch ebenso war weder mit 22Δ159-Δ_NIκBα noch mit 22Δ267-Δ_NIκBα eine auch nur partielle Inhibition der NF-κB Aktivität in den TNFα stimulierten Extrakten zu erreichen (Abb. 14). Dies war enttäuschend und überraschend zugleich, da in den Lysaten von unbehandelten Zellen die Konzentration des importierten 22Δ159-Δ_NIκBα über der des endogenen IκBα lag und nach TNFα-Behandlung der intrazelluläre Gehalt von 22Δ159-Δ_NIκBα nahezu konstant blieb (Abb. 13A), so dass zumindest von diesem Protein ein Inhibitionseffekt erwartet wurde.

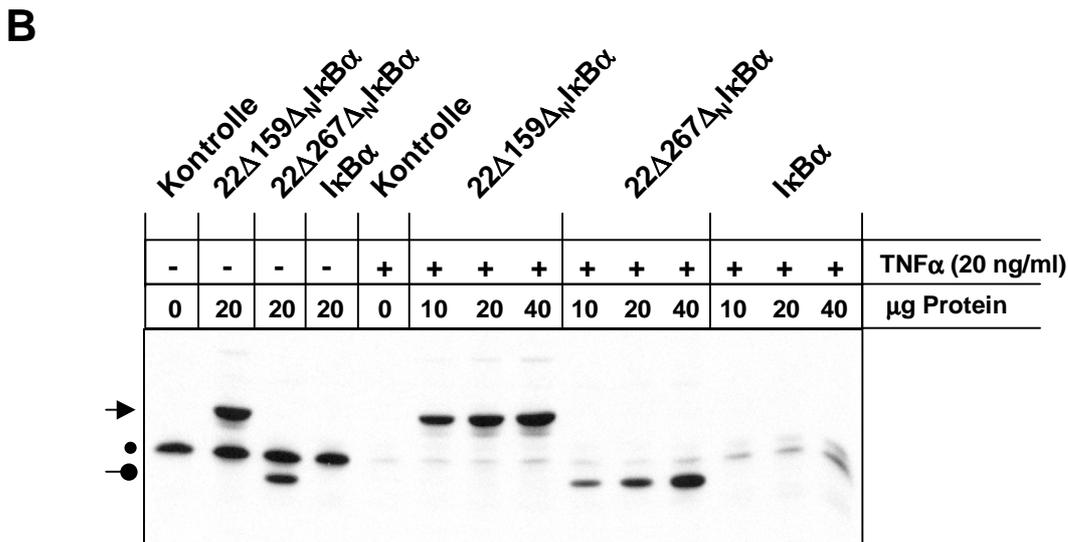
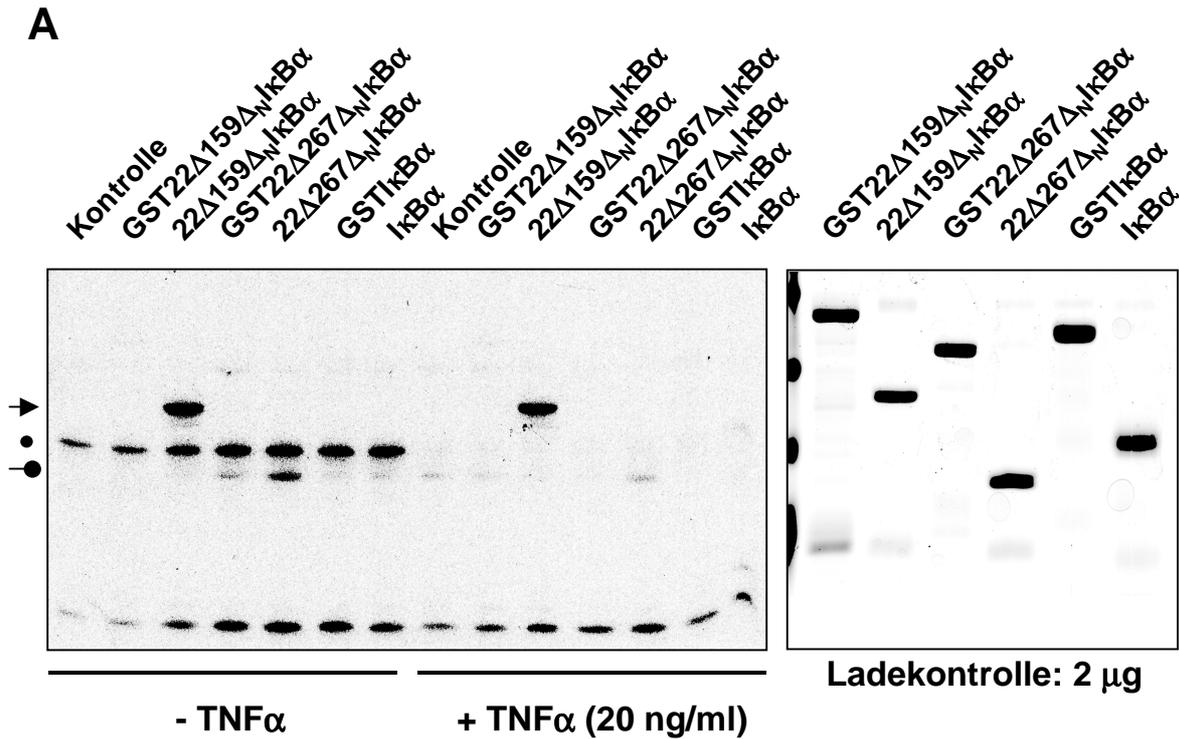


Abbildung 13: 22Δ159-Δ_NIκBα und 22Δ267-Δ_NIκBα, nicht aber ihre GST-Fusionen, werden in Zellen importiert. (A) 10 μg der angegebenen aufgereinigten Proteine wurden in 1 ml serumhaltigem Medium verdünnt und zu MCF-7 Zellen, die eine Konfluenz von 60-70 % aufwiesen, in eine 35 mm Kulturschale gegeben. Nach 30 min Inkubation bei 37°C wurden die Zellen für weitere 30 min mit TNFα (20 ng/ml) stimuliert. Anschließend wurden die Zellen geerntet und extensiv mit Vollmedium und PBS gewaschen. In den hergestellten Gesamtzellextrakten wurde die Aufnahme der Proteine durch Detektion mit einem anti-IκBα Antikörper in einem Western-Blot analysiert (linke Hälfte). 22Δ159-Δ_NIκBα ist durch einen Pfeil mit spitzem Ende, 22Δ267-Δ_NIκBα durch einen Pfeil mit rundem Ende, exogenes und endogenes IκBα durch „•“ markiert. Die Verabreichung gleicher Mengen an rekombinantem Protein wurde über ein Coomassie Brilliant Blue R250 gefärbtes SDS-Gel bestätigt, auf das jeweils 2 μg der aufgereinigten Proteine aufgetragen worden waren (rechte Hälfte). (B) Der Importassay wurde wie unter A beschrieben durchgeführt. Die Aufnahme verschiedener Dosen der Proteine wurde in einem Western-Blot der Gesamtzellextrakte (anti-IκBα Antikörper) detektiert.

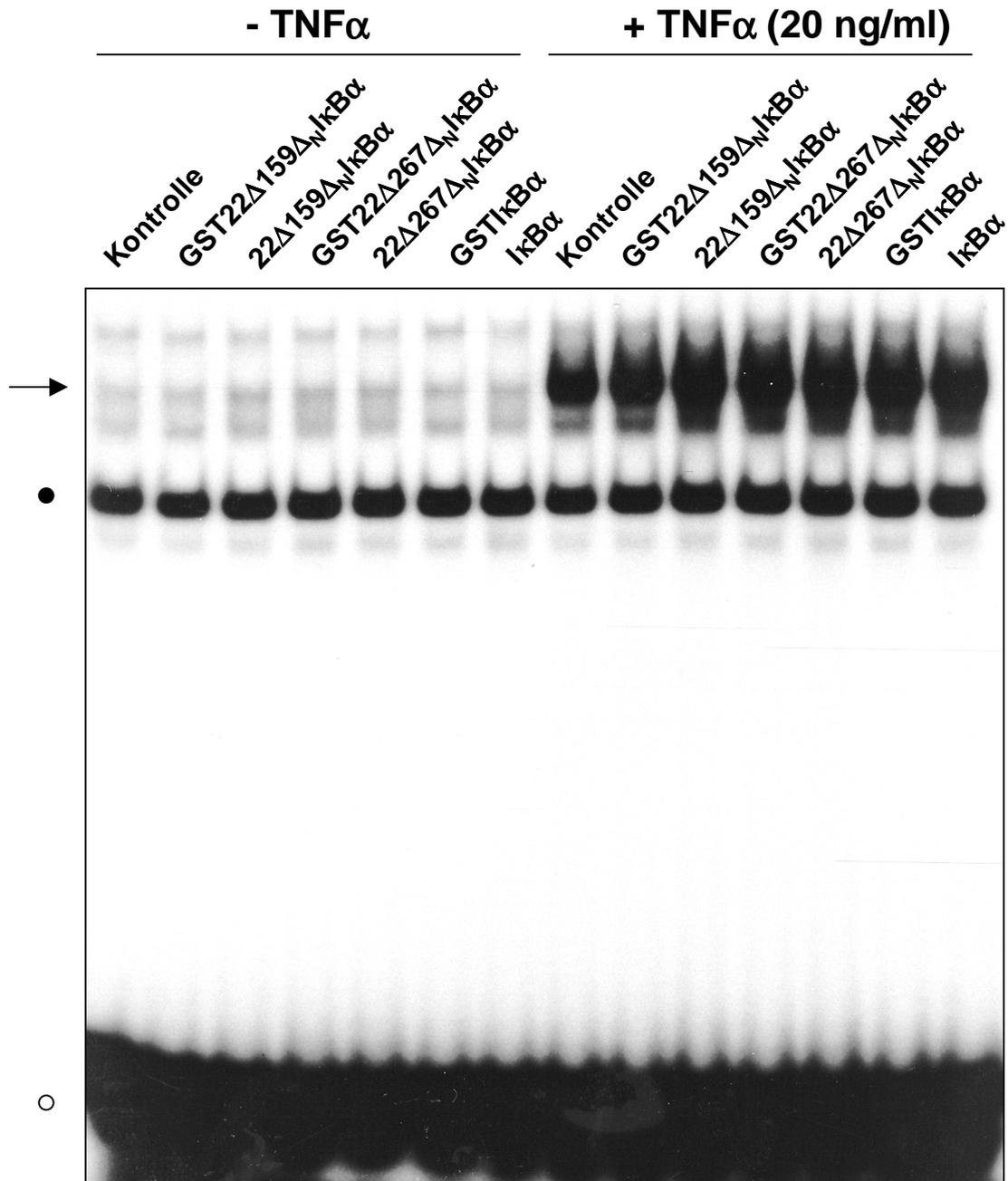


Abbildung 14: Aufgenommenes 22Δ159-Δ_NIκBα und 22Δ267-Δ_NIκBα sind nicht in der Lage, NF-κB zu inhibieren. Mit den gleichen Gesamtzelllysaten des in Abbildung 13 beschriebenen Import-Experiments wurde ein EMSA durchgeführt. Der Komplex aus aktiviertem NF-κB und dem radioaktiv markierten Oligonukleotid mit NF-κB-Erkennungsmotiv (κB-Motiv) ist mit einem Pfeil gekennzeichnet. „●“: unspezifisch auftretende Bande, die die gleichmäßige Beladung des Gels dokumentiert. „○“: freies, ungebundenes Oligonukleotid.

Dass 22Δ159-Δ_NIκBα in den *in vivo* Import-Experimenten keinen hemmenden Effekt auf die NF-κB-Aktivität zeigte, konnte darauf zurückzuführen sein, dass das aufgenommene Protein in den Zellen nicht frei zugänglich war, z. B. durch Einschluss in membranumhüllte Vesikel oder durch Aggregatbildung der Proteine. Dann hätte auch intakt importiertes, natives

22Δ159-Δ_NIκBα keine Möglichkeit, mit NF-κB-Dimeren zu wechselwirken. Das Versagen von 22Δ159-Δ_NIκBα NF-κB zu binden, konnte andererseits ebenso am Protein selbst liegen. Zwar erwiesen sich IκBα- und Δ_NIκBα-Fusionen mit komplettem VP22 nach Expression in eukaryontischen Zellen als potente NF-κB-Inhibitoren (Abb. 5), jedoch könnte die verkürzte Variante 22Δ159 zu einer Fehlfaltung des gesamten Proteins geführt haben oder mit dem IκBα-Teil in einer Weise wechselwirken, die die NF-κB-Bindung verhindert.

Die funktionelle Integrität der Fusionsproteine wurde in *in vitro*-Versuchen getestet. IκBα und Δ_NIκBα binden sowohl an freies NF-κB und an NF-κB/DNA-Komplexe, wobei sie den Transkriptionsfaktor von der DNA entfernen (1.1.2). So wurde in EMSAs untersucht, ob die aufgereinigten Proteine fähig waren, die DNA-Bindung von aktiviertem NF-κB in TNFα stimulierten Zellextrakten zu blockieren (Abb. 15). Dazu wurden geringe Mengen der Proteine (1 oder 10 ng) in der Bindungsreaktion zusammen mit Gesamtzelllysaten von TNFα behandelten MCF-7 Zellen und dem radioaktiv markierten Oligonukleotid mit der NF-κB-Konsensussequenz inkubiert. Bereits 1 ng von IκBα und GST-IκBα inhibierte vollständig die DNA-Bindung von NF-κB (Abb. 15A). Demgegenüber zeigten GST-22Δ159-Δ_NIκBα und GST-22Δ267-Δ_NIκBα keinen hemmenden Effekt, selbst bei einem Einsatz von 10 ng der rekombinanten Proteine (Abb. 15A). 1 ng von 22Δ159-Δ_NIκBα war nicht ausreichend, um NF-κB zu inhibieren, 10 ng hingegen führten zu einem vollständigen Verschwinden der NF-κB/DNA-Komplexe (Abb. 15A). 10 ng von 22Δ267-Δ_NIκBα waren nur zu einer partiellen Inhibition in der Lage (Abb. 15A). Die aufgereinigten GST-IκBα- und IκBα-Proteine waren also offensichtlich intakt und besaßen die erwartete Aktivität. Mit 22Δ159-Δ_NIκBα war es ebenfalls möglich, die DNA-Bindung von NF-κB zu blockieren, auch wenn es dabei weniger potent als GST-IκBα und IκBα war. Dies deutete darauf hin, dass die Δ_NIκBα-Sequenz in dem Fusionsprotein durchaus eine korrekte Konformation einnahm, die Wechselwirkung mit NF-κB jedoch durch das N-terminale 22Δ159 negativ beeinflusst wurde. Dieser Effekt war bei 22Δ267-Δ_NIκBα noch stärker ausgeprägt und N-terminales GST schien eine Bindung an NF-κB unmöglich zu machen.

Im Gegensatz zu den Δ_NIκBα-Fusionsproteinen erwies sich 22Δ159-IκBα in den *in vitro*-Untersuchungen als ein ebenso starker Inhibitor von NF-κB wie IκBα. In dem in Abbildung 15B gezeigten Experiment war die Konzentration der Gesamtzellextrakte höher als in dem vorangegangenen Versuch (Abb. 15A), so dass hier selbst 10 ng von 22Δ159-Δ_NIκBα keinen hemmenden Einfluss auf die DNA-Bindung von NF-κB hatte. Trotzdem war unter diesen Bedingungen bereits 1 ng von 22Δ159-IκBα für eine vollständige Inhibition ausreichend (Abb. 15B). Das Ergebnis kann so interpretiert werden, dass die N-terminale Domäne, die in 22Δ159-Δ_NIκBα entfernt wurde, als eine Art *spacer* wirkt, der verhindert, dass der 22Δ159-Teil des Moleküls mit den für die NF-κB-Bindung wichtigen Ankyrin-Wiederholungen von IκBα wechselwirkt.

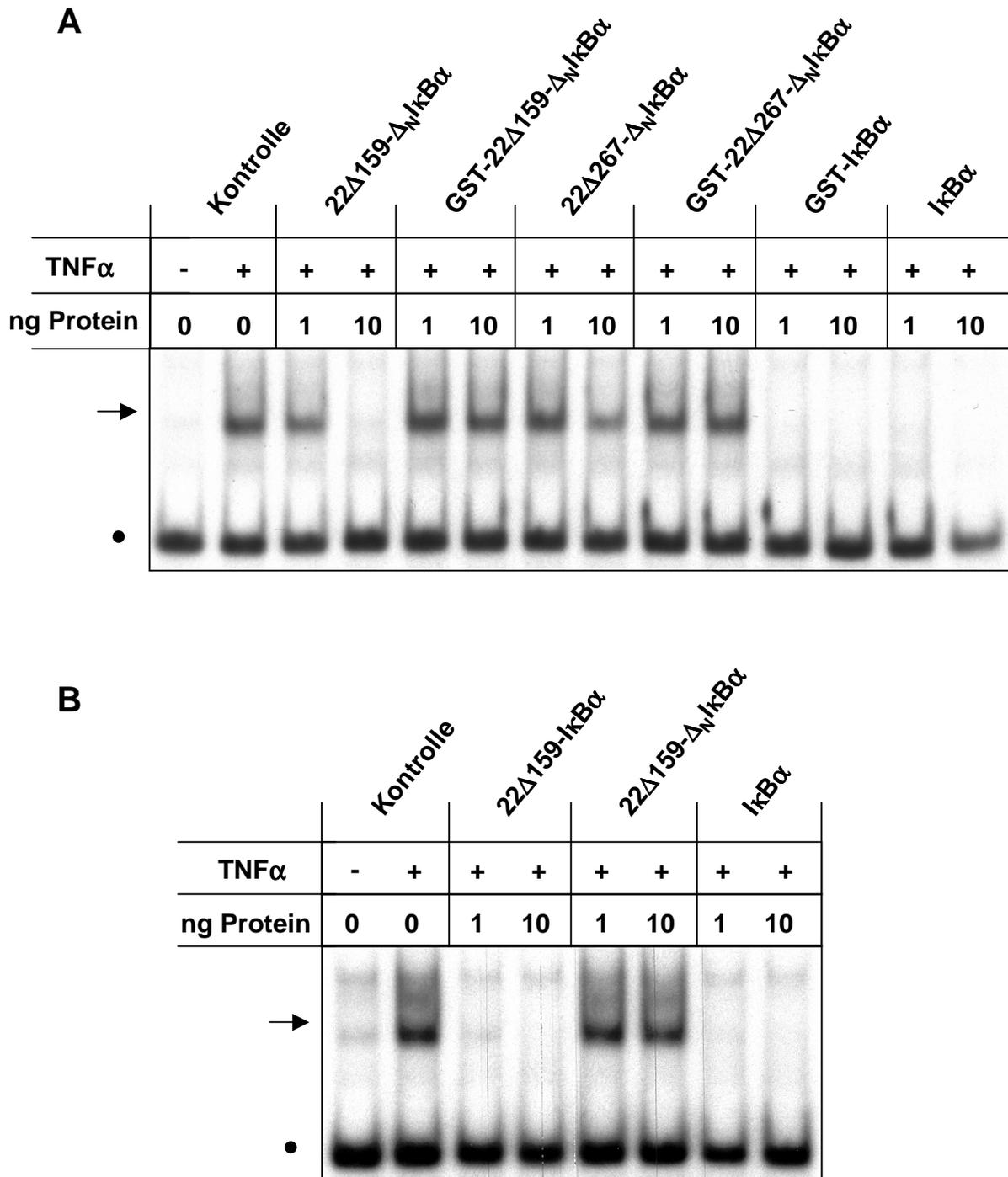


Abbildung 15: 22Δ159-IκBα und 22Δ159-Δ_NIκBα inhibieren die Bindung von NF-κB an DNA *in vitro*. Gesamtzellextrakte von unbehandelten und mit TNFα stimulierten (20 ng/ml; 45 min) MCF-7 Zellen wurden zusammen mit einem radioaktiv markierten Oligonukleotid mit NF-κB-Erkennungsmotiv (κB-Motiv) und 1 μl mit den angegebenen Mengen der aufgereinigten Proteine inkubiert. Die Bindungsreaktionen wurden auf einem nichtdenaturierenden Gel aufgetrennt. Der Komplex aus aktiviertem NF-κB und dem Oligonukleotid ist durch einen Pfeil gekennzeichnet. Die unspezifisch auftretende Bande ist durch „•“ markiert. Nicht gezeigt ist die Bande des freien, ungebundenen Oligonukleotids. Die Konzentration der Zellysate war bei dem in (B) dargestellten Versuch höher als die der Lysate des unter (A) präsentierten Experiments, was den unterschiedlichen Hemmeffekt von 22Δ159-Δ_NIκBα in den beiden Versuchen erklärt.

Genau wie 22Δ159-Δ_NIκBα wurde 22Δ159-IκBα spezifisch und effektiv in Zellen importiert, wobei die Konzentration des aufgenommenen 22Δ159-IκBα in unstimulierten Zellen ebenfalls höher war als die Konzentration von endogen synthetisiertem IκBα (Abb. 16A). Der intrazelluläre Gehalt des Proteins nahm ebenfalls nach TNFα-Behandlung der Zellen nicht ab (Abb. 16A). Aufgrund des guten Imports und der Fähigkeit von 22Δ159-IκBα, NF-κB *in vitro* effizient zu inhibieren, wurde erwartet, dass mit dem Protein auch *in vivo* Hemmeffekte zu beobachten wären. Eingesetzte Proteinmengen von 10, 20 und 40 μg waren jedoch nicht in der Lage, in MCF-7 Zellen die Bindung von aktiviertem NF-κB an seine Erkennungssequenz zu blockieren (Abb. 16B). Mit 10 μg von 22Δ159-Δ_NIκBα und 22Δ159-IκBα ließ sich eine sehr schwache Inhibition von NF-κB detektieren (Abb. 16B), der Effekt konnte aber mit niedrigeren Proteindosen nicht verstärkt werden (Daten nicht gezeigt). Eine Erhöhung der Proteinmenge schien eher aktivierend auf die Bindung von NF-κB an DNA zu wirken (Abb. 16B). Auch in HeLa Zellen wurde nach Import verschiedener Mengen der rekombinanten Proteine keine Inhibition des Transkriptionsfaktors erreicht (Daten nicht gezeigt).

22Δ159-IκBα konnte *in vitro* aktiviertes NF-κB komplexieren und die Bindung des Transkriptionsfaktors an die DNA verhindern (Abb. 15B). Das aufgereinigte Protein war somit intakt und funktionsfähig. Die Analyse des zellulären Imports mittels Western-Blot ergab, dass 22Δ159-IκBα effektiv und spezifisch aufgenommen wurde (Abb. 16A). Dass das intrazelluläre 22Δ159-IκBα NF-κB nicht inhibierte (Abb. 16B), musste somit daran liegen, dass es in der Zelle nicht mit dem aktivierten Transkriptionsfaktor wechselwirken konnte. Die Verteilung des internalisierten Proteins in der Zelle wurde daher mikroskopisch genauer untersucht. Die Immunfluoreszenzaufnahmen von fixierten und gefärbten MCF-7 Zellen zeigten, dass 22Δ159-IκBα spezifisch in den Zellen nachgewiesen werden konnte und bereits eine Dosis von 3 μg ausreichend war, um das rekombinante Protein mit einem anti-IκBα Antikörper über den Hintergrund des endogenen IκBα hinaus zu detektieren (Abb. 17). Mit zunehmender Dosis des verabreichten Proteins wurde auch mehr Protein in die Zellen aufgenommen. 22Δ159-IκBα war jedoch nicht gleichmäßig in der Zelle verteilt, sondern befand sich konzentriert in unregelmäßigen, granulären Strukturen, deren Größe und Anzahl proportional mit der verabreichten Dosis zunahm (Abb. 17). Ob es sich bei den Granula um vesikuläre, membranumhüllte Partikel oder um Proteinaggregate handelte, wurde nicht weiter analysiert. Die Anhäufung der importierten Proteine in diesen Strukturen ist sicherlich dafür verantwortlich, dass trotz effektiven Eintransports in der Zelle nicht genügend 22Δ159-IκBα-Moleküle frei zugänglich waren, um eine bemerkenswerte Inhibition von NF-κB zu erreichen.

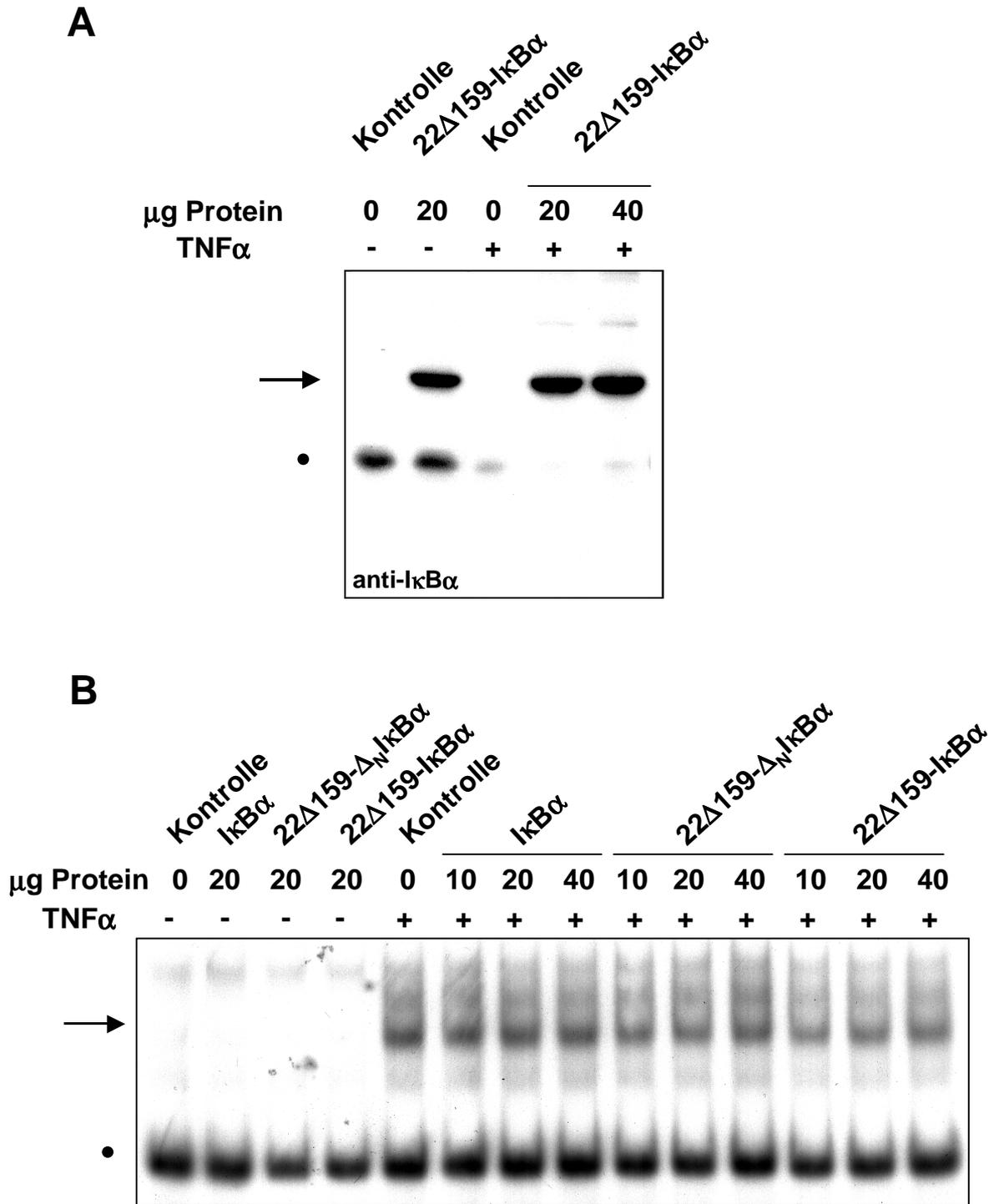


Abbildung 16: 22Δ159-IκBα ist nach Import in Zellen nicht in der Lage, NF-κB effektiv zu inhibieren. (A) Aufgereinigtes 22Δ159-IκBα wurde in den angegebenen Mengen zu MCF-7 Zellen in einer 35 mm Kulturschale gegeben. Nach 30 min Inkubation bei 37°C wurden die Zellen für weitere 30 min mit TNFα (20 ng/ml) stimuliert. Die intrazelluläre Aufnahme des Proteins wurde in hergestellten Gesamtzell-extrakten durch Detektion mit einem anti-IκBα Antikörper in einem Western-Blot analysiert. 22Δ159-IκBα ist durch einen Pfeil mit spitzem Ende, endogenes IκBα durch „•“ markiert. (B) MCF-7 Zellen wurden wie unter A angegeben mit den aufgeführten Proteinen inkubiert und mit TNFα stimuliert. Die Aktivierung von NF-κB wurde in den anschließend hergestellten Gesamtzell-extrakten in einem EMSA untersucht. Der Komplex aus aktiviertem NF-κB und dem radioaktiv markiertem Oligonukleotid ist durch einen Pfeil, die unspezifisch auftretende Bande durch „•“ gekennzeichnet. Nicht gezeigt ist die Bande des freien, ungebundenen Oligonukleotids.

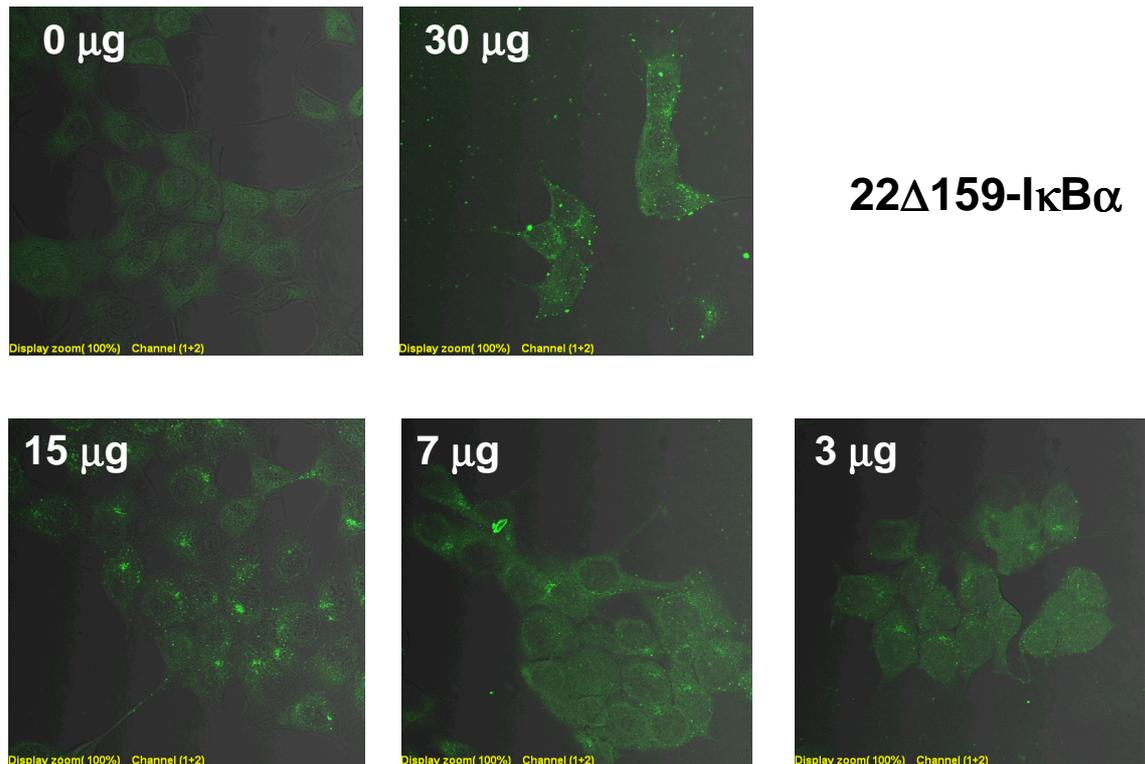


Abbildung 17: Aufgenommenes 22Δ159-IκBα ist in der Zelle in granulären Strukturen lokalisiert. MCF-7 Zellen wurden für 60 min mit 3-30 μg 22Δ159-IκBα inkubiert. Anschließend wurden die Zellen mehrfach mit serumhaltigem Medium und PBS gewaschen, fixiert, permeabilisiert und mit einem anti-IκBα Antikörper inkubiert. Der verwendete sekundäre Antikörper war mit OregonGreen™ 488 gekoppelt. Die Verteilung der importierten Proteine wurde mit einem konfokalen Laserscanmikroskop analysiert.

3.2.2 Der Lysattest

Obwohl nach Expression von VP22-IκBα-Fusionskonstrukten in eukaryontischen Zellen kein *spread* stattfand (Abb. 6), zeigten die Experimente mit bakteriell exprimierten und aufgereinigten Proteinen, dass die VP22-IκBα-Proteine durchaus Transduktionspotential besaßen (Abb. 13 u. 16). Die Konstrukte mit der längeren VP22-Variante (22Δ159) wurden dabei besser von den Zellen aufgenommen als die Fusionen mit 22Δ267 (Abb. 13). Auch erwiesen sich die 22Δ159-Fusionsproteine gegenüber den entsprechenden 22Δ267-Konstrukten als potentere NF-κB-Inhibitoren *in vitro* (Abb. 15A). Deswegen wurde getestet, ob mit dem Einsatz der kompletten VP22-Sequenz der Import noch gesteigert und die Wechselwirkung mit NF-κB verstärkt werden konnte. Außerdem war interessant zu erfahren, ob dadurch die Ausbildung der granulären Strukturen beeinflusst wurde. Es sei daran erinnert, dass direkt in eukaryontischen Zellen exprimiertes VP22-IκBα gleichmäßig im Cytoplasma verteilt war (Abb. 6) und sehr effizient die Aktivierung von NF-κB blockierte (Abb. 5). Da in *E. coli* die vollständige VP22-Sequenz nicht exprimiert werden konnte, wurde die intrazelluläre Aufnahme von VP22-IκBα zunächst in einem Lysattest untersucht. 293 Zellen wurden mit VP22-IκBα (vgl. Abb. 3) transfiziert und die Zellen nach 48 h mit einer

Kombination aus hypotonem und hypertonem Puffer ohne Detergens lysiert (s. 2.14). Mit diesen Zellextrakten wurden Import-Experimente in der gleichen Weise wie mit den aus Bakterien aufgereinigten Proteinen durchgeführt. VP22-I κ B α wurde schnell und effektiv aus den Lysaten in COS-1 Zellen importiert. Sowohl mit einem anti-VP22 Antikörper als auch mit einem anti-I κ B α Antikörper wurden beträchtliche Mengen des Proteins bereits 15 min nach Zugabe intrazellulär detektiert (Abb. 18). Doch analog zu 22 Δ 159-I κ B α war das aufgenommene VP22-I κ B α in granulären Strukturen über die gesamte Zelle verteilt, wengleich die Granula ein größeres und eher amorphes Erscheinungsbild besaßen (vgl. Abb. 17 u. 18). Demgegenüber ergab aus Lysaten aufgenommenes VP22 eine gleichmäßigere und zudem intensivere Anfärbung vor allem der Zellkerne in den betrachteten Zellen (Abb. 18).

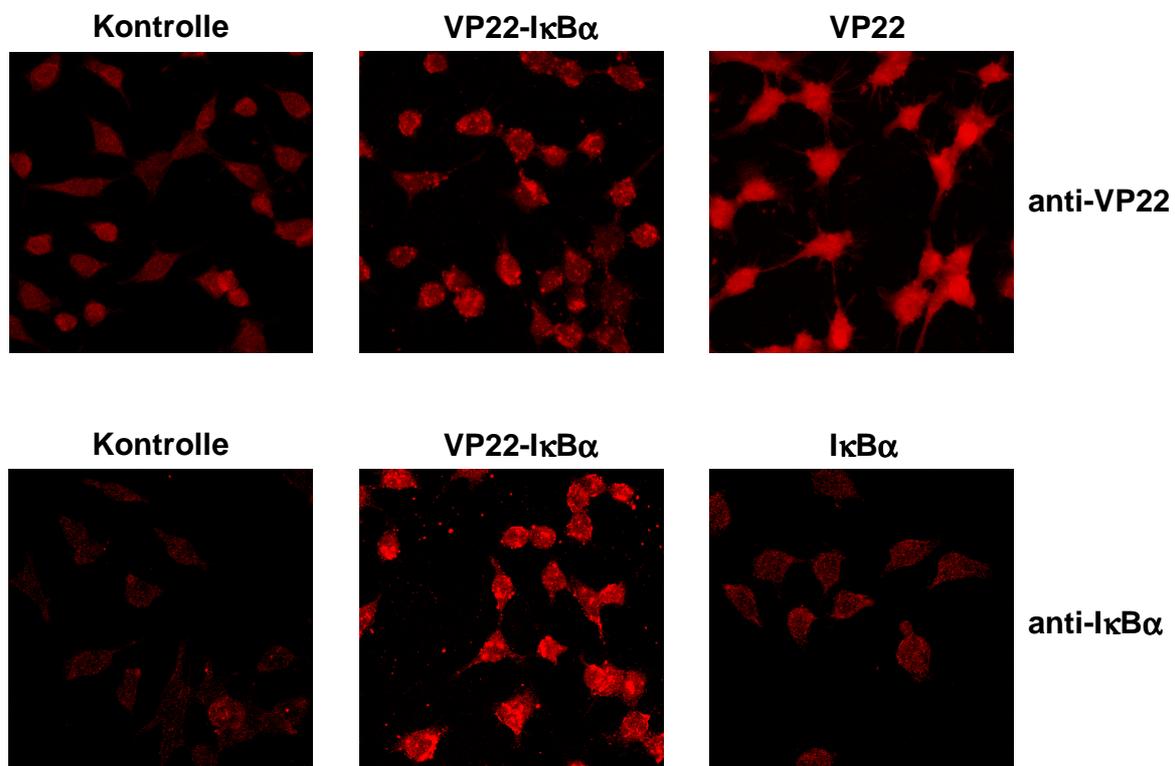


Abbildung 18: VP22 und VP22-I κ B α werden effektiv und spezifisch in Zellen eintransportiert. 293 Zellen wurden mit VP22, VP22-I κ B α , I κ B α (Konstrukte aus Abbildung 3) oder einem Leervektor (Kontrolle) transfiziert. 48 h später wurden die Zellen mit einer Kombination aus Niedrig- und Hochsalzpuffer ohne Detergens lysiert (s. 2.14). Die vereinigten Lysate von 293 Zellen aus drei 35 mm Kulturschalen, die eines der Konstrukte exprimiert hatten, wurden 1:1 mit Vollmedium gemischt und zu COS-1 Zellen in einer 35 mm Kulturschale gegeben. Nach 15 min wurden die COS-1 Zellen mehrfach mit Vollmedium und PBS gewaschen, fixiert und permeabilisiert. Die aufgenommenen Proteine wurden durch aufeinanderfolgende Inkubation mit einem anti-VP22 oder einem anti-I κ B α Antikörper und einem Rhodamin gekoppelten sekundären Antikörper gefärbt und unter einem konfokalen Laserscanmikroskop detektiert.

Die spezifische Aufnahme von VP22-I κ B α aus Lysaten von exprimierenden 293 Zellen wurde auch in HeLa Zellen beobachtet (Abb. 19). Bei stärkerer Vergrößerung (x 100) ließ sich die granuläre Verteilung des Proteins über die gesamte Zelle besonders gut erkennen

(Abb. 19; rechts unten). In HeLa Zellen wurde ebenfalls untersucht, ob das aufgenommene VP22-I κ B α in der Lage war, NF- κ B zu inhibieren. Dazu wurden die Zellen nach 15 min Inkubation mit den entsprechenden 293 Lysaten für weitere 20 min mit TNF α stimuliert. Trotz der ungleichmäßigen, granulären Verteilung des importierten Proteins konnte in einem EMSA eine markante Hemmung der DNA-Bindung des aktivierten NF- κ B nachgewiesen werden (Abb. 19; Mitte). Die Inhibition des Transkriptionsfaktors war zwar nicht vollständig, der Gehalt an aktiviertem NF- κ B lag in den HeLa Zellen nach Inkubation mit VP22-I κ B α und Stimulation mit TNF α aber nahe an dem der unstimulierten Zellen (Abb. 19). Somit wurde gezeigt, dass Fusionsproteine aus I κ B α mit der kompletten VP22-Sequenz nicht nur Transduktionspotential besaßen, sondern auch *in vivo* nach der Aufnahme in die Zellen intakt und aktiv waren.

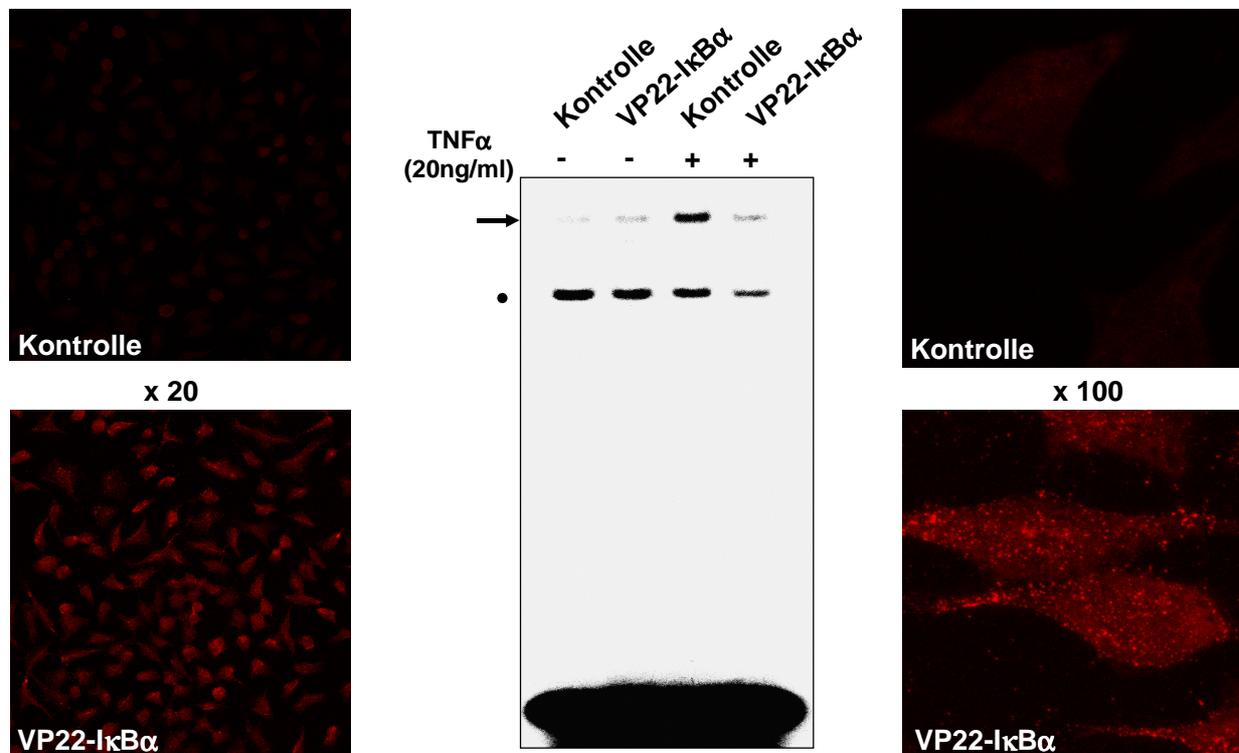


Abbildung 19: Aufgenommenes VP22-I κ B α inhibiert NF- κ B *in vivo*. HeLa Zellen wurden wie unter Abbildung 18 beschrieben für 15 min mit VP22-I κ B α enthaltenden Lysaten von 293 Zellen inkubiert. Die Immunfluoreszenzfärbungen wurden mit einem primären anti-I κ B α Antikörper und einem sekundären Rhodamin gekoppelten Antikörper durchgeführt. Die Aufnahmen wurden an einem konfokalen Laserscannmikroskop gemacht. Die Inhibition von NF- κ B durch importiertes VP22-I κ B α wurde in einem EMSA analysiert. Dazu wurden die HeLa Zellen nach 15 min Inkubation mit den entsprechenden 293 Lysaten für weitere 20 min mit TNF α stimuliert. Nach anschließendem intensivem Waschen der geernteten HeLa Zellen mit Vollmedium und PBS wurden Gesamtzellextrakte hergestellt, die mit dem radioaktiv markierten Oligonukleotid mit NF- κ B-Erkennungssequenz (κ B-Motiv) inkubiert wurden. Der Komplex aus aktiviertem NF- κ B und dem Oligonukleotid ist durch einen Pfeil gekennzeichnet. Die unspezifisch auftretende Bande ist durch „•“, das freie, ungebundene Oligonukleotid durch „o“ markiert.

3.2.3 Baculovirale Expression von VP22-I κ B α

Die Anwendung der Proteintransduktionstechnologie für therapeutische Zwecke erfordert den Einsatz hochreiner Proteine und Peptide, um durch Verunreinigung auftretende Nebeneffekte zu vermeiden. Es wurde daher nach einer Möglichkeit gesucht, das in den Lysattests erfolgreich eingesetzte VP22-I κ B α in aufgereinigter Form zu erhalten. Zunächst wurde versucht, exprimiertes GST-I κ B α -VP22, VP22-GST-I κ B α und VP22-I κ B α aus 293 Zellen durch Ionenaustausch-Chromatographie und/oder Reinigung über GSH-Sepharose zu isolieren. Bereits Vorversuche im kleinen Maßstab ließen erkennen, dass die Expressionsrate zu niedrig und die resultierende Ausbeute zu gering war (Daten nicht gezeigt). Auch die transiente und stabile Expression in Sf-9 Insektzellen blieb aus den genannten Gründen erfolglos (Daten nicht gezeigt). Als Methode der Wahl erwies sich schließlich die baculovirale Expression von VP22-I κ B α in Sf-9 Insektzellen.

Die baculovirale Expression ermöglicht die Aufreinigung geringer Mengen VP22-I κ B α

Die drei klonierten Konstrukte VP22-I κ B α , VP22 und I κ B α wurden mit einem N-terminalen (His)₆-Epitop exprimiert, das die Aufreinigung der Proteine über Ni-NTA-Metallaffinitätschromatographie ermöglichen sollte (Abb. 20A). Von jedem der drei Konstrukte wurden mehrere reine, rekombinante Virusstocks mit hohem Titer ($> 10^7$ pfu (*plaque forming units*)/ml) hergestellt. Die Expression der Proteine in Sf-9 Zellen konnte im Gegensatz zum bakteriellen System nicht eindeutig auf einem Coomassie-gefärbten Gel nachgewiesen werden, in Western-Blots wurden die Proteine jedoch detektiert und die Expressionsrate lag deutlich höher im Vergleich zu transient transfizierten 293 und Sf-9 Zellen oder stabil transfizierten Sf-9 Zellen (Daten nicht gezeigt). Abbildung 20B zeigt den Expressionstest von zwei reinen Virusstocks mit rekombinantem VP22-I κ B α (1A und 6A). Sf-9 Zellen wurden mit zwei verschiedenen MOI-Werten für 24 h, 48 h und 72 h infiziert (MOI: *multiplicity of infection*; der MOI-Wert gibt an, wieviele Viruspartikel auf eine Zelle während der Infektion entfallen). Auffallend war, dass sich trotz des Einsatzes gleicher Virusmengen die Virusstocks stark in der Menge der produzierten Proteine unterschieden. Nach Infektion mit VP22-I κ B α 1A wurde wesentlich mehr Protein synthetisiert als nach Infektion mit VP22-I κ B α 6A bei entsprechenden MOI-Werten. Die Zunahme des exprimierten Proteins bei längerer Infektionsdauer fiel nach Infektion mit 1A ebenfalls deutlich stärker aus. Mit der Steigerung der Expressionsrate traten aber gleichzeitig auch mehr Degradationsprodukte auf (Abb. 20B). Nach Lyse der infizierten Sf-9 Zellen verblieb ein Teil des produzierten Proteins trotz Verwendung eines Hochsalzpuffers mit 1% NP-40 (vgl. 2.8) in der Pelletfraktion (Abb. 20C; „P“). Im Mediumüberstand der Zellen konnte zu keinem Zeitpunkt rekombinantes Protein detektiert werden (Abb. 20; „Ü“), obwohl nach 72 h die durch Virus verursachte Lyse der infizierten Sf-9 Zellen einsetzte. Generell wurden VP22 und I κ B α stärker und mit weniger auftretenden Abbauprodukten exprimiert als VP22-I κ B α (VP22: Abb. 20C, letzte Spur; I κ B α

nicht gezeigt). Da eine hohe Expression ein entscheidender Parameter für die Isolierung größerer Proteinmengen ist, wurden für die Aufreinigung von VP22-I κ B α Sf-9 Zellen für 72 h mit stark exprimierenden Virusstocks wie 1A und einem MOI-Wert von 10 infiziert, trotz der hierdurch vermehrten Degradation der produzierten Proteine.

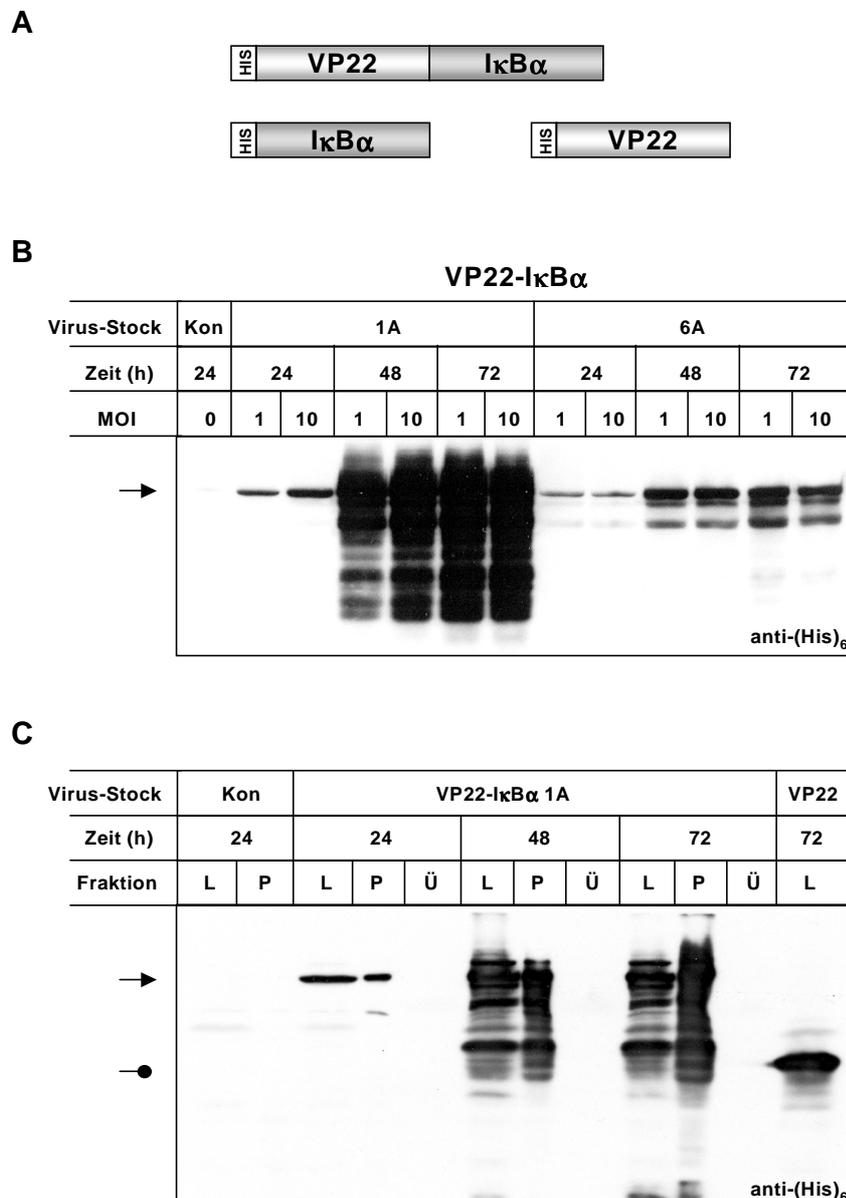


Abbildung 20: Baculovirale Expression von VP22-I κ B α . (A) Für die baculovirale Expression wurden VP22-I κ B α , VP22 und I κ B α in den Vektor pBlueBacHis2 A mit N-terminalem His₆-Epitop einkloniert (vgl. 2.2.1). (B) Sf-9 Insektenzellen wurden mit den reinen, rekombinanten Virusstocks VP22-I κ B α 1A und 6A infiziert. Der MOI-Wert (*multiplicity of infection*) gibt an, wieviele Viruspartikel während der Infektion auf eine Zelle entfallen. Nach 24, 48 und 72 h wurden die Zellen geerntet und in SDS-Ladepuffer lysiert. Die produzierten Proteine wurden in einem Western-Blot mit einem anti-(His)₆-Epitop Antikörper detektiert. (C) Sf-9 Zellen wurden mit dem Virusstock VP22-I κ B α 1A (MOI: 10) infiziert. Nach den angegebenen Zeitpunkten wurde der Mediumüberstand („Ü“) abgenommen und die Zellen in TOTEX-Puffer lysiert (vgl. 2.8). Das klare Lysat („L“) wurde durch Abzentrifugieren der Membranbestandteile des Rohlysats („P“, Pellet) erhalten. Die Verteilung des exprimierten Proteins auf die drei Fraktionen wurde in einem Western-Blot mit einem anti-(His)₆-Epitop Antikörper analysiert. In der letzten Spur ist exprimiertes VP22 im klaren Lysat von Sf-9 Zellen gezeigt, die für 72 h mit einem reinen VP22-Virusstock (MOI: 10) infiziert wurden.

In Vorversuchen wurde festgestellt, dass in Analogie zu den bakteriell exprimierten 22Δ159-Fusionsproteinen eine direkte affinitätschromatographische Aufreinigung der baculoviral exprimierten Konstrukte nicht möglich war (Daten nicht gezeigt). Die Bindung intakter rekombinanter Proteine an Ni-NTA-Agarose erforderte eine Vorreinigung über Ionenaustausch-Chromatographie (Abb. 21). Die bessere Expression von VP22 und IκBα spiegelte sich auch in der Ausbeute und Reinheit der Proteine nach Reinigung über Ionenaustauscher und Ni-NTA-Agarose aus gleichen Mengen infizierter Sf-9 Zellen wider: Während VP22 und IκBα den Hauptanteil in den Elutionsfraktionen der Ni-Säule ausmachte, wurden wesentlich geringere Mengen VP22-IκBα in den entsprechenden Fraktionen gefunden bei gleichzeitig erhöhter Elution von Nebenprodukten (Abb. 21).

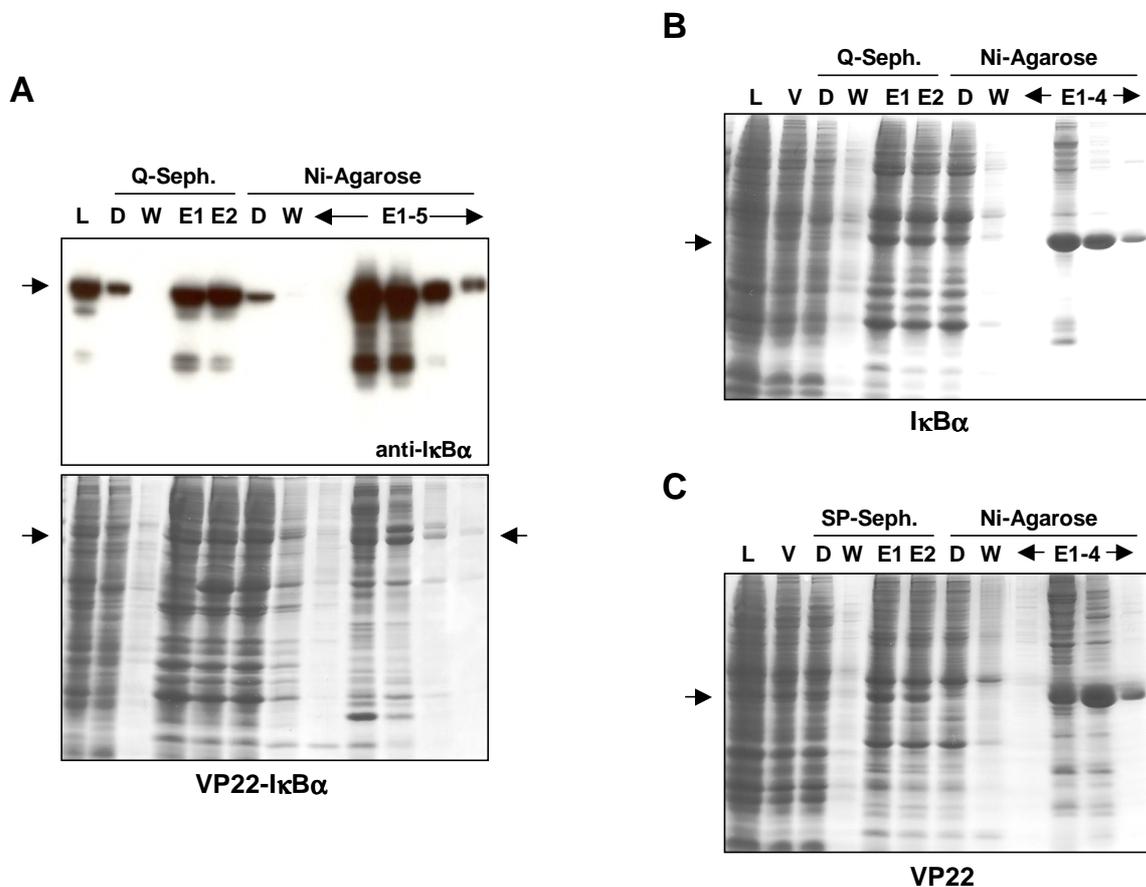


Abbildung 21: Aufreinigung der baculoviral exprimierten Konstrukte über Ionenaustauscher und Ni-NTA-Agarose. Jeweils 30 175 cm² Kulturflaschen mit 2 x 10⁷ Sf-9 Zellen wurden mit einem MOI-Wert von 10 der entsprechenden Virusstocks für 72 h infiziert. Die Lyse der Zellen und die Aufreinigung der Proteine erfolgte wie unter 2.8 beschrieben. Gezeigt sind Coomassie Brilliant Blue R250 gefärbte SDS-Gele, die die Reinigung von (A; unterer Teil) VP22-IκBα, (B) IκBα und (C) VP22 über Ionenaustauscher und Ni-NTA-Agarose dokumentieren. Die Position der Banden der rekombinanten Proteine ist durch einen Pfeil markiert. Zur eindeutigen Identifizierung der VP22-IκBα-Banden wurde mit den gleichen Fraktionen zusätzlich ein Western-Blot durchgeführt. VP22-IκBα wurde durch einen anti-IκBα Antikörper detektiert (A; oberer Teil). L: klares Lysat; V: Verdünnung des klaren Lysats vor Ausschütteln über Q- oder SP-Sepharose; D: Durchlauf; W: Waschfraktion; E: Eluat.

Die Eluate der Ni-NTA-Agarose wurden in einem dritten Reinigungsschritt nochmals über einen Ionenaustauscher fraktioniert, VP22-I κ B α und I κ B α über eine Mono-Q-Säule, VP22 über eine Mono-S-Säule. Dabei führte ein teilweises Ausfallen während der Dialyse der Ni-NTA-Eluate sowie eine unvollständige Wiedergewinnung des Proteins nach Elution von der Mono-Q-Säule zu einem weiteren Verlust an VP22-I κ B α . Zusätzlich wies VP22-I κ B α ein ungewöhnlich breites Elutionsprofil von der Mono-Q-Säule auf (Abb. 22), was eine verminderte Konzentration des Proteins im Vergleich zu I κ B α und VP22 zur Folge hatte (Tab. 2). Insgesamt war daher die Ausbeute an VP22-I κ B α auch bei wesentlich höherem Einsatz an infizierten Sf-9 Zellen deutlich geringer als an den beiden anderen Proteinen (Tab. 2). Alle drei Proteine konnten jedoch in hochaufgereinigter Form erhalten werden (Abb. 22; Tab. 2).

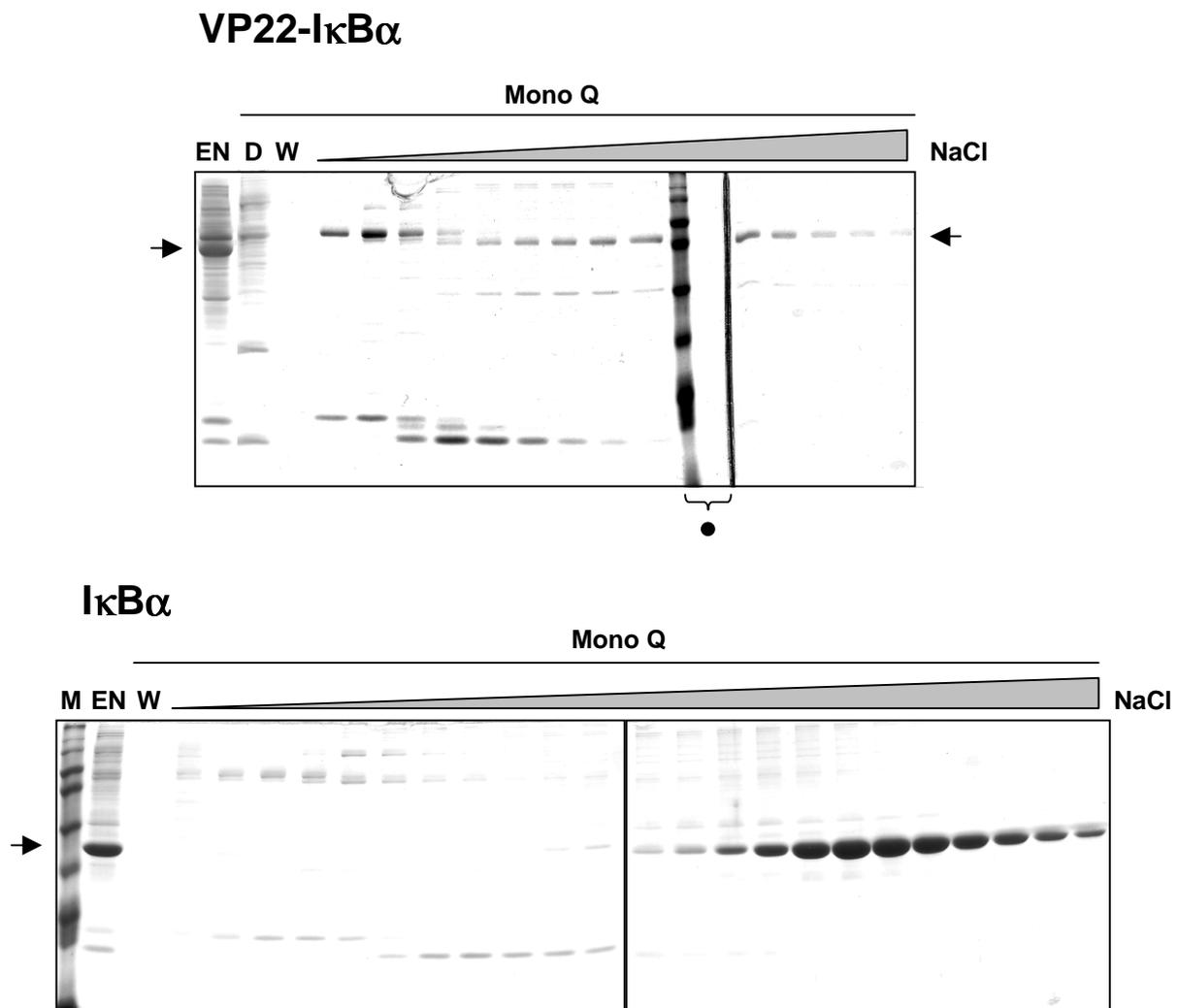


Abbildung 22: Vergleich des finalen Reinigungsschritts über eine Mono-Q-Säule von VP22-I κ B α und I κ B α . EN: gepoolte Eluate von der Ni-Säule; D: Durchlauf; W: Waschfraktion; M: Proteinmarker; „•“: Ende des linken oberen Gels mit Proteinmarker. Die an die Mono-Q gebundenen Proteine wurden in einem linearen Gradienten mit steigender NaCl Konzentration eluiert. Die Fraktionen wurden auf Coomassie Brilliant Blue R250 gefärbten SDS-Gelen analysiert. Die rekombinanten Proteine sind mit einem Pfeil gekennzeichnet.

	VP22-IκBα	IκBα	VP22
Einsatz (Sf-9 Zellen)	12 x 10 ⁸	6 x 10 ⁸	6 x 10 ⁸
Konzentration	80 µg/ml	350 µg/ml	250 µg/ml
Gesamtausbeute	150 µg	1100 µg	800 µg
Reinheit ²	> 95%	> 95%	> 95%

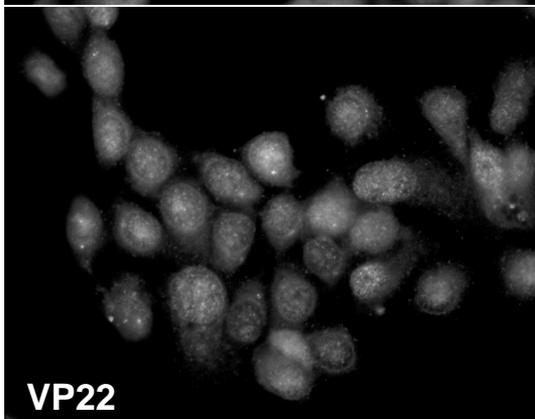
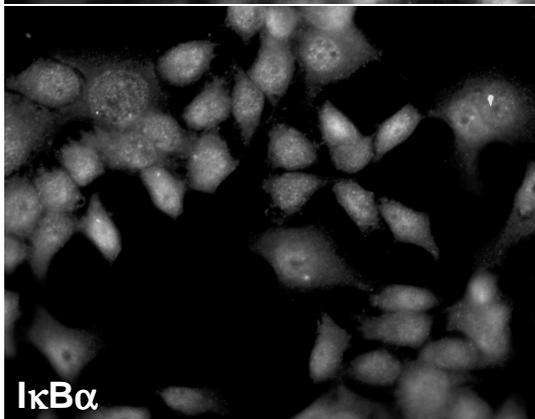
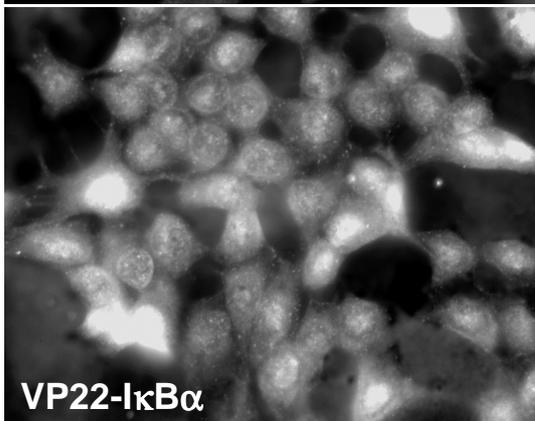
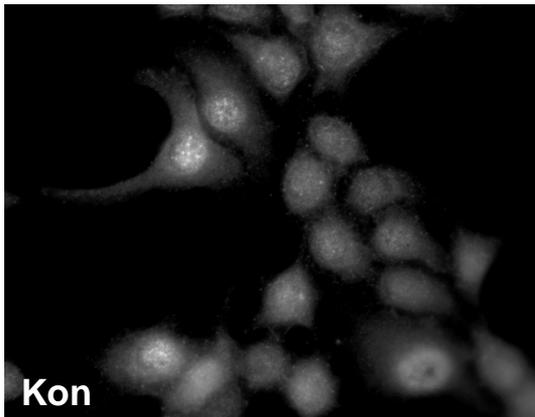
Tabelle 2: Die Ausbeute und Konzentration von baculoviral exprimiertem und aufgereinigtem VP22-IκBα war sehr gering. Repräsentative Aufreinigungen der drei Konstrukte sind als Beispiel aufgeführt. Es ist zu beachten, dass für die Aufreinigung von VP22-IκBα doppelt so viele infizierte Zellen eingesetzt wurden wie für die beiden anderen Proteine.

Baculoviral exprimiertes VP22-IκBα besitzt Proteintransduktionspotential und inhibiert NF-κB *in vitro*

Es gab bisher keine Erfahrungswerte mit aufgereinigten Fusionsproteinen, die die komplette VP22-Sequenz enthielten. Der limitierende Faktor für anstehende Experimente waren die geringen Mengen an gereinigtem VP22-IκBα, die zur Verfügung standen. Zunächst sollte getestet werden, ob VP22-IκBα funktionell aktiv war, sowohl was sein Proteintransduktionspotential betraf als auch seine Fähigkeit NF-κB zu binden. Der Einsatz von bereits 3 µg der gereinigten Proteine war ausreichend, um eine spezifische Aufnahme von VP22 und VP22-IκBα in MCF-7 Zellen mittels indirekter Immunfluoreszenz nachzuweisen (Abb. 23). Nach Färbung mit einem anti-IκBα Antikörper besaßen die Zellen, die mit VP22-IκBα inkubiert worden waren, eine deutlich höhere Fluoreszenzintensität als die mit IκBα oder VP22 inkubierten Zellen (Abb. 23; linke Spalte). Die im Vergleich zu einem anti-(His)₆-Epitop Antikörper verstärkte Hintergrundfärbung wurde durch endogenes IκBα verursacht. Die Detektion der Proteine mit dem anti-(His)₆-Epitop Antikörper zeigte den spezifischen Import von VP22 und VP22-IκBα. Rekombinantes IκBα konnte nicht in den Zellen detektiert werden. Die Aufnahme von VP22 erfolgte etwas effektiver als die von VP22-IκBα und das eintransportierte VP22 war im Zellkern lokalisiert (Abb. 23; rechte Spalte). Sowohl mit dem anti-IκBα als auch mit dem anti-(His)₆-Epitop Antikörper wurden charakteristische granuläre Strukturen nach Import von VP22-IκBα beobachtet, die ebenfalls gehäuft in und um den Zellkern aufzutreten schienen. Die genaue Lokalisation von VP22-IκBα in der Zelle war im Vergleich zu VP22 jedoch weniger klar definiert.

² Die Reinheit der aufgereinigten Proteine wurde in den ausgewählten und vereinigten Eluaten der Mono-Q- bzw. Mono-S-Säule anhand der Intensität der auftretenden Banden auf einem Coomassie gefärbten SDS-Gel abgeschätzt.

anti-I κ B α



anti-(His) $_6$

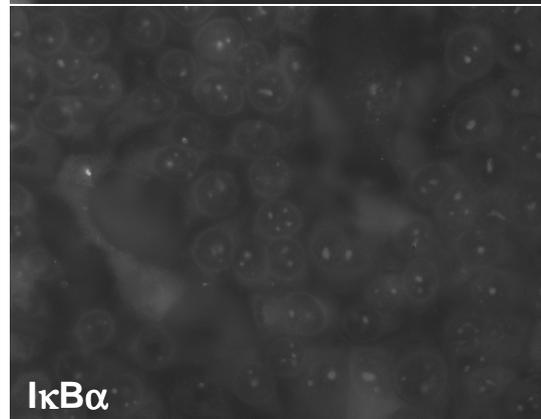
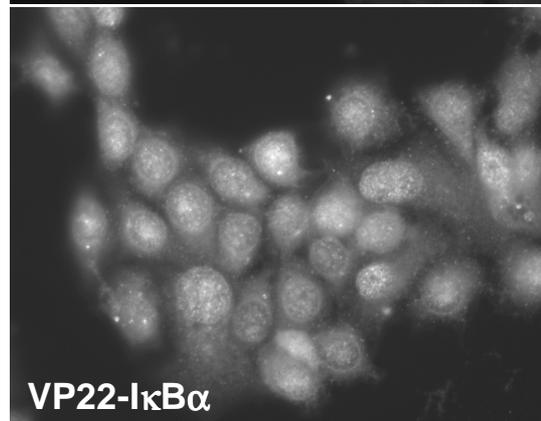
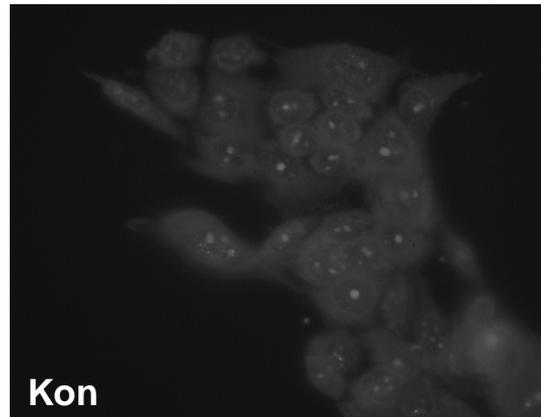


Abbildung 23 (vorherige Seite): Baculoviral exprimiertes VP22 und VP22-IκBα werden spezifisch von Zellen aufgenommen. MCF-7 Zellen in einer 35 mm Kulturschale wurden für 20 min mit jeweils 3 µg der rekombinanten Proteine in Vollmedium inkubiert. Nach Fixierung und Permeabilisierung der Zellen wurden die Proteine durch einen anti-IκBα oder einen anti-(His)₆-Epitop Antikörper und einen sekundären Rhodamin gekoppelten Antikörper gefärbt. Die Fluoreszenzaufnahmen wurden mit einem Fluoreszenzmikroskop (Nikon Eclipse TE300) unter Verwendung der SpotAdvanced Software gemacht.

Die Fähigkeit von VP22-IκBα, NF-κB zu komplexieren, wurde wie bereits für die bakteriell exprimierten Proteine beschrieben (Abb. 15) zunächst *in vitro* untersucht. Rekombinantes VP22-IκBα und IκBα erwiesen sich hierbei als sehr potente NF-κB-Inhibitoren. Jeweils 1 ng der Proteine war ausreichend, um selbst in konzentrierten Gesamtzellextrakten von TNFα stimulierten MCF-7 Zellen die Bindung von aktiviertem NF-κB an seine Erkennungssequenz vollständig zu unterbinden (Abb. 24). VP22 hatte erwartungsgemäß keinen Einfluss auf die DNA-Bindung von NF-κB (Abb. 24).

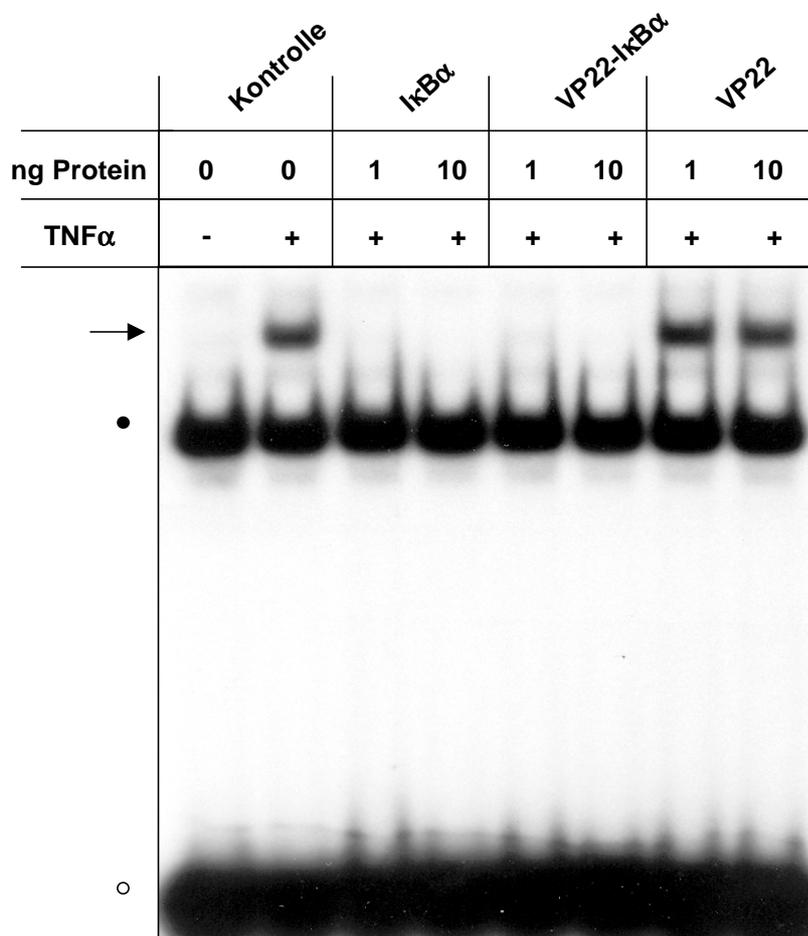


Abbildung 24: VP22-IκBα inhibiert die DNA-Bindung von NF-κB *in vitro*. Gesamtzellextrakte von unbehandelten und mit TNFα stimulierten (20 ng/ml; 45 min) MCF-7 Zellen wurden zusammen mit einem radioaktiv markierten Oligonukleotid mit NF-κB-Erkennungsmotiv (κB-Motiv) und 1 µl mit den angegebenen Mengen der aufgereinigten Proteine inkubiert. Die Bindungsreaktionen wurden auf einem nichtdenaturierenden Gel aufgetrennt. Der Komplex aus aktiviertem NF-κB und dem Oligonukleotid ist durch einen Pfeil gekennzeichnet. Die unspezifisch auftretende Bande ist durch „•“, das freie, ungebundene Oligonukleotid durch „○“ markiert.

Baculoviral exprimiertes VP22-I κ B α inhibiert NF- κ B *in vivo*

Nachdem gezeigt worden war, dass das baculoviral exprimierte VP22-I κ B α nicht nur hinsichtlich seines Proteintransduktionspotentials funktionell aktiv war, sondern ebenfalls *in vitro* in der Lage war, mit NF- κ B zu wechselwirken, wurde getestet, ob das Protein nach der Aufnahme in die Zelle NF- κ B auch *in vivo* inhibieren konnte. In Gesamtzellextrakten von H21 Zellen, die mit 3 μ g rekombinantem VP22-I κ B α oder VP22 inkubiert worden waren, wurden beide Proteine mit einem anti-(His)₆-Epitop Antikörper detektiert (Abb. 25B). Der intrazelluläre Gehalt des importierten VP22 lag dabei deutlich über dem von VP22-I κ B α (Abb. 25B), was in Übereinstimmung mit den Immunfluoreszenzdaten war (Abb. 23) und auf einen effektiveren Import des „nackten“ VP22 hindeutete. H21 ist ein HeLa Zellklon mit hoher basaler NF- κ B-Aktivität, so dass bereits in unbehandelten Zellen eine beträchtliche DNA-Bindung des Transkriptionsfaktors beobachtet wurde (Abb. 25A, Spur 1). Das aufgenommene VP22-I κ B α reichte aus, um diese basale Aktivierung von NF- κ B stark zu unterdrücken (Abb. 25A, Spur 3). Die Abnahme der Bandenintensität des NF- κ B/Oligonukleotid-Komplexes in Extrakten unbehandelter Zellen, die mit VP22 inkubiert wurden (Abb. 25A, Spur 2), ist weniger auf einen unspezifischen Hemmeffekt zurückzuführen als vielmehr auf eine geringere Beladung der Gelspur. Dies wird durch die schwache unspezifische Bande („•“) verdeutlicht, die in allen EMSAs als Ladekontrolle diente. VP22 besaß ebenfalls keinen inhibitorischen Einfluss auf die Aktivierung von NF- κ B durch TNF α (Abb. 25A, Spur 5). Die Blockierung der DNA-Bindung von NF- κ B durch aufgenommenes VP22-I κ B α war zwar nicht vollständig, es ist jedoch beachtlich, dass selbst nach TNF α -Stimulation die Aktivität von NF- κ B so weit erniedrigt wurde, dass sie nur wenig über der von unbehandelten Kontrollzellen lag (Abb. 25A, vgl. Spur 1 und 6).

Auch in MCF-7 Zellen wurde mit 3 μ g von VP22-I κ B α eine starke Hemmung der TNF α induzierten NF- κ B-Aktivierung erreicht (Abb. 26A). Während VP22 und I κ B α keinen Einfluss auf die DNA-Bindung von NF- κ B nach TNF α -Behandlung hatten, ergab ein Vergleich der Intensität der Banden des aktivierten NF- κ B, das an das markierte Oligonukleotid gebunden hatte, eine Inhibition des Transkriptionsfaktors um das Drei- bis Vierfache in Extrakten von MCF-7 Zellen, die mit VP22-I κ B α inkubiert worden waren (Abb. 26A). Da MCF-7 Zellen keine basale Aktivierung von NF- κ B aufweisen, wurde auf die Analyse des Imports der Proteine in unstimulierten Zellen in diesem Experiment verzichtet. VP22 und VP22-I κ B α wurden nach Internalisierung und TNF α -Behandlung in den entsprechenden Gesamtzellextrakten mit einem anti-VP22 und einem anti-(His)₆-Epitop Antikörper detektiert (Abb. 26C). Demgegenüber konnte die intrazelluläre Aufnahme von rekombinantem I κ B α mit dem anti-(His)₆-Epitop Antikörper nicht nachgewiesen werden (Abb. 26C), was die Spezifität des VP22 vermittelten Imports unterstrich. Dass das Fehlen der I κ B α -Bande nicht ein Erkennungsproblem des anti-(His)₆-Epitop Antikörpers war, zeigte die Kontrolle der eingesetzten Proteine vor der Inkubation mit den MCF-7 Zellen. Alle drei

rekombinanten, aufgereinigten Proteine wurden durch den Antikörper erkannt (Abb. 26B, linker Teil). Die Kontrolle der Proteine auf einem Coomassie Brilliant Blue R250 gefärbten SDS-Gel und mittels Western-Blot ergab zudem, dass offensichtlich nicht genau 3 μg , sondern ungleiche Mengen der Proteine eingesetzt worden waren. Die I κ B α -Bande war sowohl auf dem Proteingel als auch auf dem Western-Blot stärker, die VP22-Bande hingegen wesentlich schwächer im Vergleich zu VP22-I κ B α (Abb. 26B). Das erklärt ebenfalls die im Gegensatz zu den vorherigen Experimenten scheinbar bessere Aufnahme von VP22-I κ B α gegenüber VP22 (Abb. 26C).

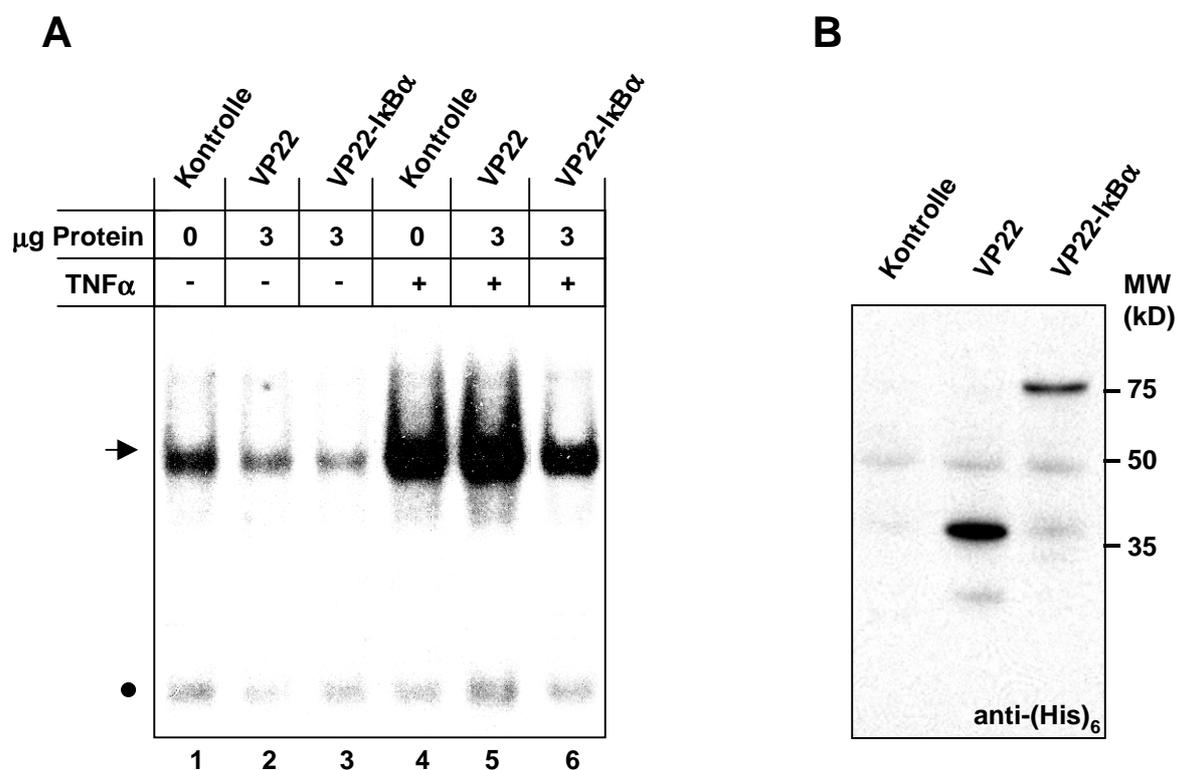


Abbildung 25: VP22-I κ B α hemmt die basale und die induzierte Aktivität von NF- κ B nach Import in H21 Zellen. H21 ist ein HeLa Zellklon mit hoher basaler NF- κ B-Aktivität. H21 Zellen in einer 35 mm Kulturschale wurden mit jeweils 3 μg baculoviral exprimiertem und aufgereinigtem VP22 oder VP22-I κ B α für 15 min inkubiert. Anschließend wurde ein Teil der Zellen für weitere 15 min mit 20 ng/ml TNF α stimuliert. Von allen Ansätzen wurden dann nach extensivem Waschen der Zellen mit Vollmedium und PBS Gesamtzellextrakte hergestellt. (A) EMSA. Der Komplex aus aktiviertem NF- κ B und radioaktiv markiertem Oligonukleotid mit κ B-Bindestelle ist durch einen Pfeil, die unspezifisch auftretende Bande ist durch „•“ gekennzeichnet. In Spur 2 wurde offensichtlich weniger Zellextrakt eingesetzt, da die unspezifische Bande, die als Ladekontrolle dient, deutlich schwächer als in den anderen Spuren ist. (B) Western-Blot. Die aufgenommenen Proteine wurden in Extrakten aus unstimulierten Zellen mit einem anti-(His)₆-Epitop Antikörper detektiert.

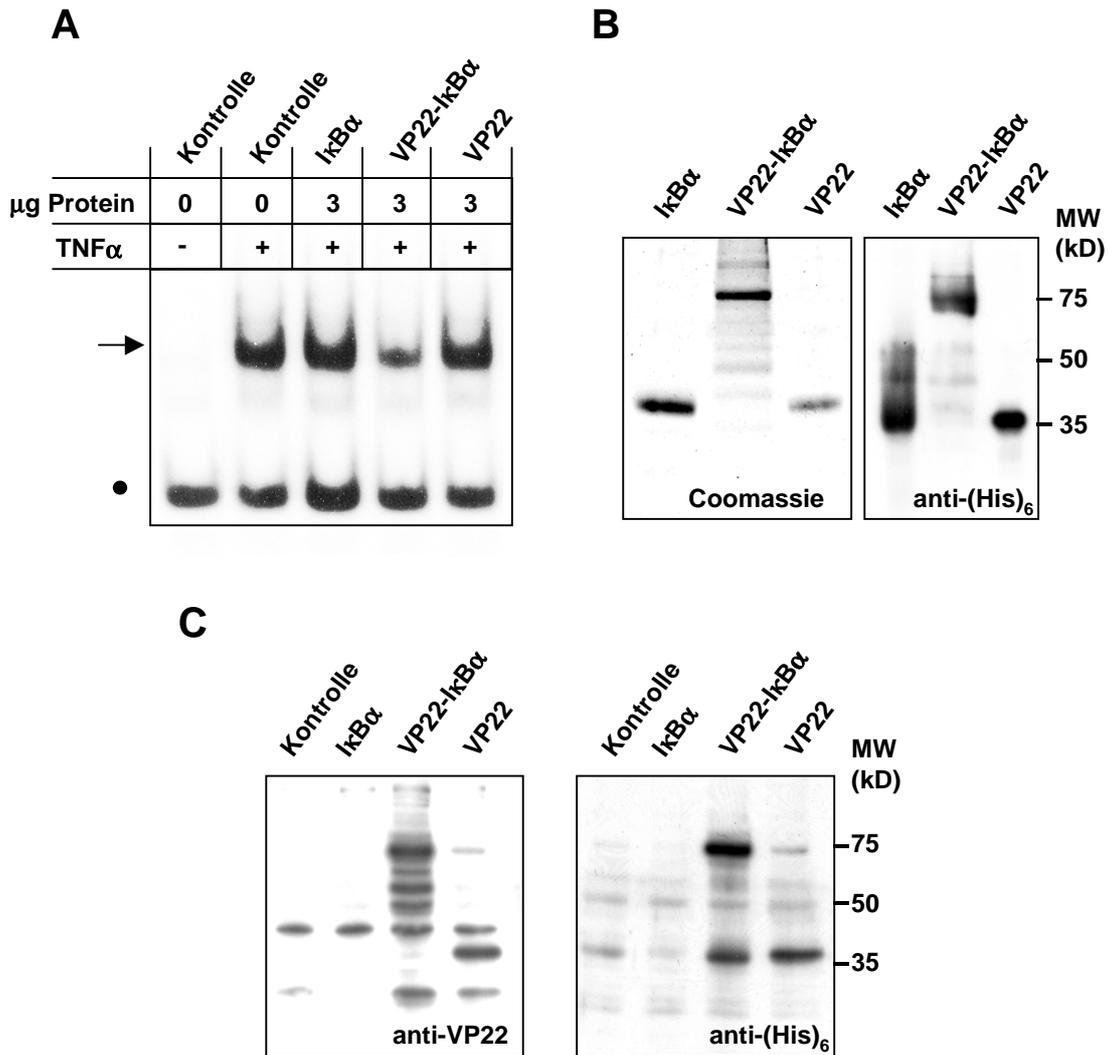


Abbildung 26: Importiertes VP22-IκBα inhibiert NF-κB nach TNFα-Stimulation in MCF-7 Zellen. MCF-7 Zellen in einer 35 mm Kulturschale wurden mit jeweils 3 μg baculoviral exprimiertem und aufgereinigtem IκBα, VP22 oder VP22-IκBα für 15 min inkubiert. Anschließend wurden die Zellen für weitere 15 min mit 20 ng/ml TNFα stimuliert. Von allen Ansätzen wurden dann nach extensivem Waschen der Zellen mit Vollmedium und PBS Gesamtzellextrakte hergestellt. (A) EMSA. Der Komplex aus aktiviertem NF-κB und radioaktiv markiertem Oligonukleotid mit κB-Bindestelle ist durch einen Pfeil, die unspezifisch auftretende Bande ist durch „•“ gekennzeichnet. (B) Kontrolle des Einsatzes gleicher Mengen der rekombinanten Proteine. Linker Teil: Coomassie Brilliant Blue R250 gefärbtes SDS-Gel, auf das vermeintlich jeweils 0,5 μg der Proteine aufgetragen wurde. Rechter Teil: Detektion von vermeintlich jeweils 50 ng der Proteine durch einen anti-(His)₆-Epitop Antikörper. (C) Western-Blot. Die intrazelluläre Aufnahme der Proteine wurde nach TNFα-Stimulation der Zellen mit einem anti-VP22 und einem anti-(His)₆-Epitop Antikörper detektiert.

In den bisherigen Experimenten wurde die spezifische Aufnahme von baculoviral exprimiertem VP22-IκBα gezeigt. Bereits geringe Mengen des rekombinanten Proteins (etwa 3 μg) waren ausreichend, um eine beachtliche Inhibition von NF-κB *in vivo* zu erzielen. Dennoch war die Hemmung des Transkriptionsfaktors nicht vollständig. Es wurde daher untersucht, ob mit einer Erhöhung der Dosis des verabreichten Proteins die inhibitorische Wirkung weiter gesteigert werden konnte. Der Einsatz von 10 μg führte tatsächlich zu einer

nahezu kompletten Hemmung der DNA-Bindung von NF- κ B nach TNF α -Stimulation in MCF-7 Zellen (Abb. 27A). Die gleiche Menge an rekombinantem VP22 hatte keinen Einfluss auf die induzierte NF- κ B-Aktivierung, mit I κ B α wurde jedoch eine schwache Inhibition beobachtet (Abb. 27A). Die Analyse des Imports mittels Western-Blot deckte auf, dass in den Gesamtzellextrakten der stimulierten MCF-7 Zellen noch geringe Mengen von rekombinantem I κ B α mit einem anti-(His)₆-Epitop Antikörper detektiert werden konnten (Abb. 27B, linker Teil). Somit waren die Zellen während der Ernte nicht stringent genug gewaschen worden und der verbleibende Anteil an I κ B α in den Extrakten bewirkte eine schwache, partielle Inhibition von NF- κ B. Die I κ B α -Bande auf dem Western-Blot war im Vergleich zu VP22 und VP22-I κ B α so schwach, dass dennoch in diesem Experiment zwischen spezifischer intrazellulärer Aufnahme durch Proteintransduktion und unspezifischem Auftreten der Proteine in den Extrakten unterschieden werden konnte. Auch unter Berücksichtigung, dass ein geringer Anteil der beobachteten Inhibition von NF- κ B durch VP22-I κ B α auf unspezifische Effekte zurückzuführen sein könnte, verbleibt eine sehr starke Hemmung des Transkriptionsfaktors, die spezifisch importiertem VP22-I κ B α zuzuschreiben war.

3.3 Das Pep-1 System

Mit den bisherigen Experimenten wurde nachgewiesen, dass aufgereinigte Fusionsproteine bestehend aus I κ B α und VP22 Proteintransduktionspotential besitzen. Baculoviral exprimiertes VP22-I κ B α sowie bakteriell exprimierte Fusionen von I κ B α mit der C-terminalen Hälfte von VP22 (22 Δ 159) wurden effektiv und spezifisch in verschiedene Zelllinien transportiert (Abb. 12; Abb. 23). Selbst die 34 C-terminalen Aminosäuren von VP22 (22 Δ 267), angehängt an den N-Terminus von I κ B α , waren ausreichend, um einen Import zu ermöglichen (Abb. 13). Während die bakteriell synthetisierten Proteine leider nicht in der Lage waren, NF- κ B nach der intrazellulären Aufnahme zu inhibieren (Abb. 14), erwies sich die Fusion von I κ B α mit der kompletten VP22-Sequenz als ein sehr potenter Inhibitor der NF- κ B-Aktivität (Abb. 25-27). Der limitierende Faktor für eine weiterführende Anwendung dieses Proteins war die Schwierigkeit, das Protein in ausreichender Menge zu erhalten. Das einzige System, das eine ausreichende Synthese und die Aufreinigung von VP22-I κ B α überhaupt möglich machte, war die baculovirale Expression in Sf-9 Zellen. Die Ausbeute und Konzentration an rekombinantem Protein waren bei immensem Aufwand jedoch so gering, dass jeweils nur wenige Experimente durchgeführt werden konnten (Tab. 2). Die Probleme, VP22-I κ B α zu exprimieren und aufzureinigen, sind sicherlich in den physiko-chemischen Eigenschaften des Fusionsproteins begründet (s. 4.1.3). VP22 oder I κ B α alleine zu erhalten, stellte keine Schwierigkeit dar (Abb. 21; Tab. 2). Hier schien das synthetische Importpeptid Pep-1 eine Alternative zur Generierung von I κ B α -Fusionsproteinen zu bieten.

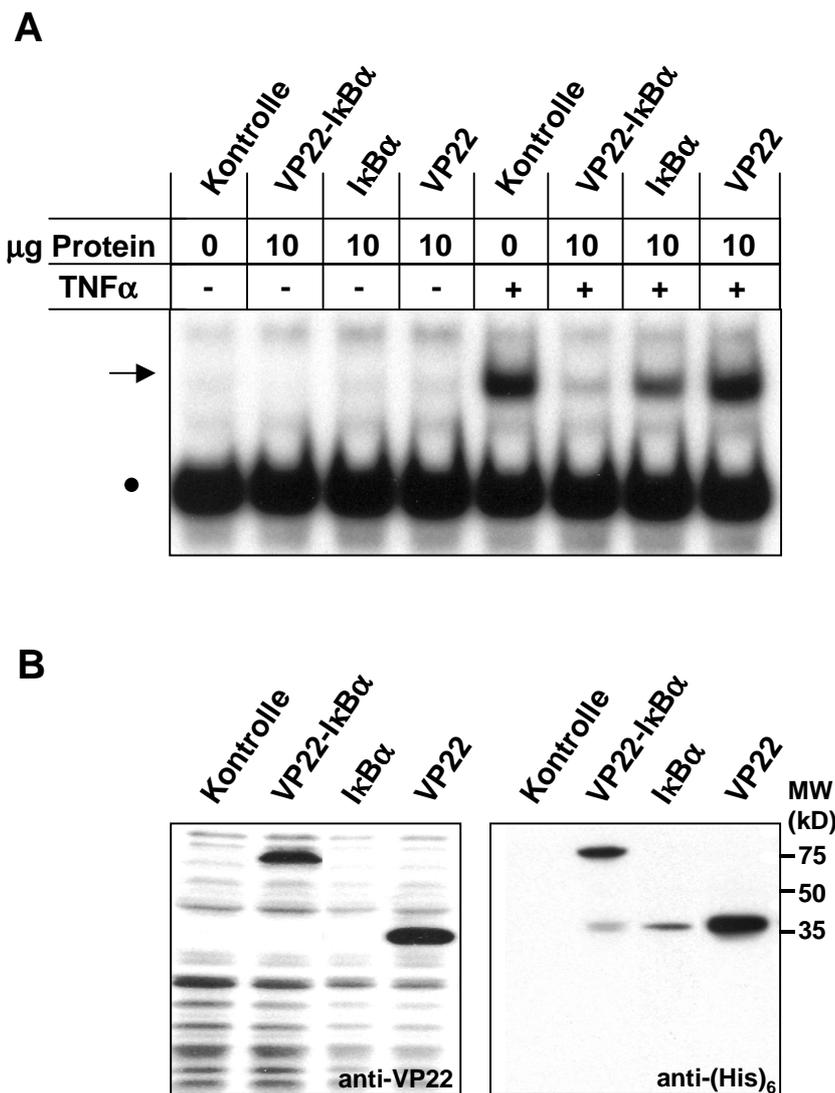


Abbildung 27: Der inhibitorische Effekt von VP22-IκBα kann durch Erhöhung der Dosis des verabreichten Proteins noch gesteigert werden. MCF-7 Zellen wurden wie unter Abb. 26 beschrieben mit jeweils 10 μg der rekombinanten Proteine inkubiert, stimuliert und geerntet. (A) EMSA. Der Komplex aus aktiviertem NF-κB und radioaktiv markiertem Oligonukleotid mit κB-Bindestelle ist durch einen Pfeil, die unspezifisch auftretende Bande ist durch „•“ gekennzeichnet. (B) Western-Blot. Die Aufnahme der Proteine in TNFα stimulierten Zellen wurde mit einem anti-VP22 und einem anti-(His)₆-Epitop Antikörper detektiert.

Das 21 Aminosäuren umfassende Pep-1 besteht aus drei Domänen (Abb. 28): 1. einem tryptophanreichen Motiv (KETWWETWWTEW), das für die Wechselwirkung mit der Zellmembran und dem zu importierenden Protein verantwortlich ist, 2. einer kurzen Trennsequenz (SQP) und 3. einem basischen Motiv (KKKRKV), das der Kernimportsequenz des großen T-Antigens von Simian Virus 40 (SV-40) entspricht und für einen effektiven intrazellulären Eintransport benötigt wird (Morris *et al.*, 2001). Morris *et al.* wiesen eine spezifische und effektive intrazelluläre Aufnahme von GFP und der β-Galactosidase mit Hilfe von Pep-1 nach.

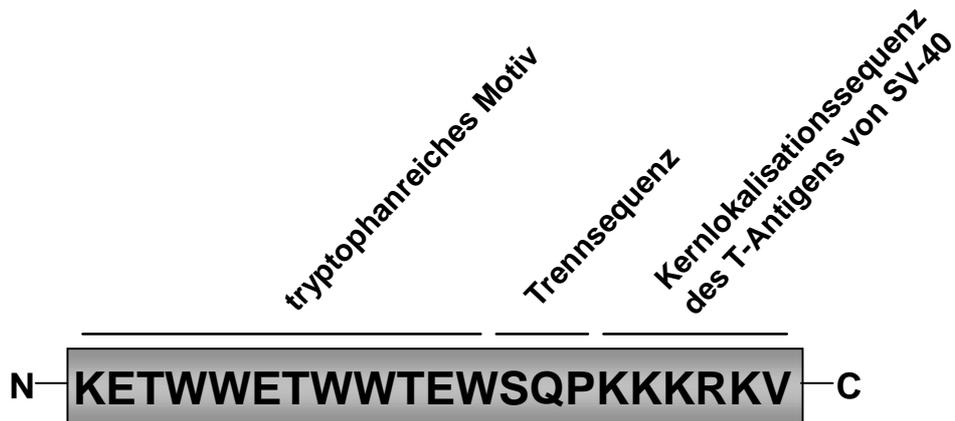


Abbildung 28: Sequenz und Organisation des Importpeptids Pep-1 (Morris *et al.*, 2001).

Etwa zur gleichen Zeit wurde auch beschrieben, dass die C-terminale Hälfte von VP22 in der Lage war, Oligonukleotide effizient in Zellen einzuliefern, ohne dass dafür eine Fusion der Moleküle notwendig war (Normand *et al.*, 2001). Das basische VP22 bildete mit den sauren Oligonukleotiden über elektrostatische Wechselwirkungen Komplexe, die in die Zelle aufgenommen wurden. Da I κ B α ein sehr saures Protein ist, bot sich damit eine weitere mögliche Alternative, I κ B α in Zellen zu importieren, ohne Fusionsproteine exprimieren und reinigen zu müssen.

Die Fähigkeit von Pep-1 und VP22, I κ B α in Zellen einzubringen, wurde mit bakteriell exprimiertem I κ B α mit einem N-terminalen (His)₆-Epitop getestet. Das rekombinante Protein war 3-4 kD größer als reines I κ B α ohne Epitop, was eine eindeutige Unterscheidung von importiertem Protein und endogenem I κ B α in Western-Blots ermöglichte. Bakteriell synthetisiertes und aufgereinigtes 22 Δ 159 bekam den Vorzug vor baculoviral exprimiertem VP22, da es der von Normand *et al.* eingesetzten VP22-Variante am nächsten kam.

Zunächst wurde versucht, das optimale Mengenverhältnis von Pep-1 bzw. 22 Δ 159 zu I κ B α für eine effektive Internalisierung zu bestimmen. Dazu wurden 10 μ g rekombinantes I κ B α mit verschiedenen Mengen von Pep-1 und 22 Δ 159 inkubiert und zu H21 Zellen in einer 35 mm Kulturschale gegeben. In die Zellen aufgenommenes I κ B α wurde mit einem anti-I κ B α Antikörper detektiert. Mit bereits 10 μ g von Pep-1 wurde ein spezifischer Import von I κ B α erreicht, der mit steigendem Einsatz von Pep-1 stärker wurde. Mit 80 μ g Pep-1 wurde ein Maximum erreicht, größere Mengen von Pep-1 konnten die Aufnahme von I κ B α nicht weiter steigern (Daten nicht gezeigt). Der Import der I κ B α /Pep-1-Komplexe in die Zellen war mindestens genauso effektiv wie der Import der 22 Δ 159-I κ B α -Fusionsproteine (vgl. Abb. 29A und Abb. 16A). Der intrazelluläre Gehalt von internalisiertem I κ B α lag deutlich über dem des endogen synthetisierten I κ B α und auch nach Stimulation mit TNF α war das rekombinante Protein noch in hoher Konzentration in der Zelle vorhanden (Abb. 29A). Vergleichbare Ergebnisse wurden mit MCF-7 Zellen erhalten (Daten nicht gezeigt).

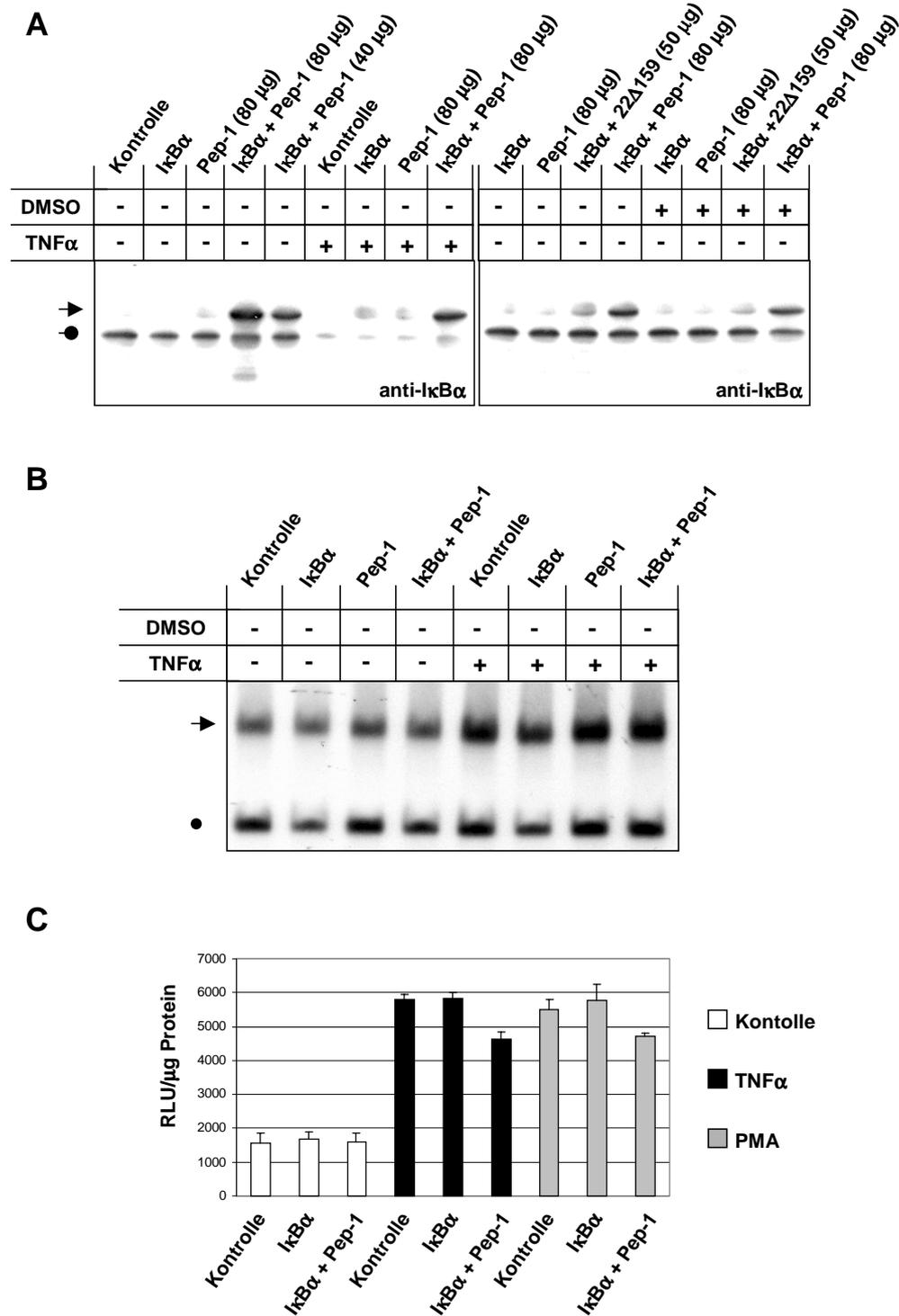


Abbildung 29: I κ B α wird spezifisch und effektiv durch Pep-1 in Zellen importiert, ist aber nicht in der Lage, NF- κ B zu inhibieren. (A) In einer 35 mm Kulturschale ausgesäte H21 Zellen wurden wie unter 2.11 beschrieben mit I κ B α (10 μ g) alleine, I κ B α (10 μ g)/Pep-1-Komplexen oder in analoger Vorgehensweise mit I κ B α (10 μ g)/22 Δ 159 Mischungen in Gegenwart oder Abwesenheit von 10% DMSO inkubiert. Nach Ernte der Zellen durch Trypsinierung und extensivem Waschen mit Vollmedium und PBS wurden Gesamtzellextrakte hergestellt. Importiertes I κ B α wurde in einem Western-Blot durch einen anti-I κ B α Antikörper detektiert. Aufgenommenes rekombinantes I κ B α (Pfeil mit spitzem Ende) konnte aufgrund seiner veränderten elektrophoretischen Mobilität durch das N-terminale (His) $_6$ -Epitop gut von endogenem I κ B α (Pfeil mit rundem Ende) unterschieden werden. (B) Die DNA-Bindungsaktivität in den unter A beschriebenen Gesamtzellextrakten

wurde in einem EMSA analysiert. Es wurden die Extrakte von den Zellen eingesetzt, die mit I κ B α alleine, 80 μ g Pep-1 bzw. den I κ B α /Pep-1 (80 μ g)-Komplexen inkubiert worden waren. Der Komplex aus aktiviertem NF- κ B und radioaktiv markiertem Oligonukleotid mit κ B-Erkennungsmotiv ist durch einen Pfeil, die unspezifisch auftretende Bande durch „•“ gekennzeichnet. Nicht gezeigt ist die Bande des freien, ungebundenen Oligonukleotids. (C) H21 Zellen in einer 35 mm Kulturschale wurden 24 h nach Transfektion mit dem Reporterplasmid 6 κ B (s. 2.16) wie unter 2.11 beschrieben mit I κ B α (10 μ g) alleine oder I κ B α (10 μ g)/Pep-1 (80 μ g)-Komplexen inkubiert. Einige Ansätze wurden gleichzeitig mit TNF α (20 ng/ml) oder PMA (100 ng/ml) stimuliert. Die Inkubation wurde in diesem Experiment auf 5 h ausgedehnt. Alle Messansätze wurden als Duplikate angelegt. Die gemessene Luciferaseaktivität (RLU, „*relative light units*“) wurde auf den Gesamtproteingehalt der Lysate normiert.

Im Gegensatz zu Pep-1 konnte mit I κ B α /22 Δ 159-Komplexen kein nennenswerter Import in H21 Zellen (Abb. 29A) und MCF-7 Zellen (Daten nicht gezeigt) beobachtet werden. Selbst bei einem Einsatz eines großen Überschusses an 22 Δ 159 (100 μ g zu 10 μ g I κ B α) konnten nur minimale Mengen an rekombinantem I κ B α in den Zellen detektiert werden (Daten nicht gezeigt).

Trotz der durch Pep-1 vermittelten effektiven Aufnahme von I κ B α in die Zellen war es nicht möglich, eine Inhibition der DNA-Bindung von NF- κ B in einem EMSA nachzuweisen. Die hohe Konzentration des in H21 Zellen akkumulierten I κ B α war nicht in der Lage, die basale oder die durch TNF α induzierte Aktivierung des Transkriptionsfaktors auch nur partiell zu hemmen (Abb. 29B). Pep-1 und I κ B α alleine hatten ebenfalls keinen Einfluss auf die Wechselwirkung von aktiviertem NF- κ B mit seiner Erkennungssequenz (Abb. 29B).

In Reporterstudien wurde eine leichte Hemmung der TNF α und PMA induzierten Aktivierung von NF- κ B in MCF-7 Zellen gefunden (Abb. 29C). Der inhibitorische Effekt war allerdings sehr schwach (etwa 15% im Vergleich zu stimulierten Kontrollzellen) und die transkriptionelle Aktivität von NF- κ B lag immer noch deutlich über der von unstimulierten Zellen (Abb. 29C).

Für einige Proteine konnte gezeigt werden, dass die Effizienz des Pep-1 vermittelten intrazellulären Imports in Gegenwart von 10% DMSO erhöht wurde und die aufgenommenen Proteine eine gleichmäßigere Verteilung in der Zelle aufwiesen (Dr. Jörg Plümpe, Firma Active Motif, persönliche Mitteilung). Durch die Verwendung von DMSO konnte jedoch keine Steigerung der Aufnahme von I κ B α durch Pep-1 oder 22 Δ 159 erreicht werden (Abb. 29A, linker Teil). Auch das in Gegenwart von DMSO importierte I κ B α bewirkte keine Hemmung von NF- κ B (Daten nicht gezeigt).

Pep-1 vermittelte im Gegensatz zu 22 Δ 159 eine effektive intrazelluläre Akkumulation von rekombinantem I κ B α . In Analogie zu den 22 Δ 159-I κ B α -Fusionsproteinen war das aufgenommene Protein aber unfähig, NF- κ B zu inhibieren. Somit stellten das Pep-1 System und der Versuch, I κ B α über Komplexbildung mit 22 Δ 159 in Zellen einzubringen, keine Alternativen zu den VP22-I κ B α Fusionsproteinen dar.

4 Diskussion

Die Proteintransduktionstechnologie ermöglicht den gezielten intrazellulären Import biologisch aktiver Peptide und Proteine. Sie stellt eine Alternative zur klassischen Genterapie dar in Fällen, in denen es auf eine vorübergehende, aber effiziente Akkumulation eines Genproduktes in einem bestimmten Gewebe ankommt (Ford *et al.*, 2000). In der vorliegenden Arbeit wurde versucht, mit Hilfe der Proteintransduktionstechnologie das I κ B-Protein I κ B α und das NF- κ B/Rel-Protein p65 ohne Transaktivierungsdomäne (p65 Δ TAD) in Zellen einzuschleusen mit dem Ziel, den Transkriptionsfaktor NF- κ B zu inhibieren. Eine erhöhte, konstitutive Aktivierung von NF- κ B wird mit einigen schwerwiegenden Erkrankungen wie chronischen Entzündungen und Krebs in Verbindung gebracht (1.1.7).

4.1 Perspektiven der Proteintransduktionstechnologie zur Inhibition von NF- κ B durch I κ B α und p65 Δ TAD

Als Vermittler des intrazellulären Imports von I κ B α und p65 Δ TAD wurde zunächst das Herpes simplex-Virus Typ-1 (HSV-1) Strukturprotein VP22 gewählt. VP22 besitzt gegenüber anderen Proteinen mit Transduktionseigenschaft wie dem Antennapedia Protein (ANTP) aus *Drosophila* und dem Tat-Protein aus HIV-1 den Vorteil einer zusätzlichen transzellulären Migration, die als *spread* bezeichnet wird. VP22-Fusionsproteine werden nicht nur nach exogener Zugabe in Zellen aufgenommen, sondern auch nach Transfektion und Expression aus der Produzentenzelle in zahlreiche benachbarte Zellen, die nicht transfiziert wurden, eintransportiert (1.2; Elliott und O'Hare, 1997). Somit bietet aus der Familie der Proteine, die einen Transmembrantransport vermitteln, VP22 die vielseitigsten Anwendungsmöglichkeiten.

4.1.1 Intrazelluläre Aufnahme von VP22-I κ B α -Fusionsproteinen

Die intrazelluläre Aufnahme von exogen verabreichtem VP22 war bisher lediglich aus ungereinigten Rohlysaten von VP22 exprimierenden Zellen nachgewiesen worden (Elliott und O'Hare, 1997). Im Rahmen der vorliegenden Arbeit konnte mittels Western-Blot Analyse und indirekter Immunfluoreszenzfärbung erstmals die spezifische Internalisierung hochreiner, rekombinanter VP22-Fusionsproteine in Zellen dokumentiert werden. Baculoviral exprimiertes VP22-I κ B α sowie bakteriell synthetisiertes 22 Δ 159-I κ B α und 22 Δ 159- Δ _NI κ B α wurden schnell und effektiv in Zellen importiert (3.2; Abb. 12, 13, 23, 25-27). Es wurde gezeigt, dass I κ B α -Proteine auch Transduktionspotential erhielten, wenn sie nur mit den C-terminalen 34 Aminosäuren von VP22 fusioniert wurden (22 Δ 267- Δ _NI κ B α ; Abb. 13). VP22-Mutanten, denen diese 34 Aminosäuren fehlen, weisen keine transzelluläre Migration auf (Elliott und O'Hare, 1997; Aints *et al.*, 2001). Über die Rolle des C-terminalen Endes von VP22 für den intrazellulären Eintransport nach exogener Zugabe war bisher nichts bekannt.

Die Effektivität des Imports von 22Δ267 Fusionsproteinen war jedoch im Vergleich zu den längeren VP22-Varianten schwächer (3.2; Abb. 13). Somit sind die 34 C-terminalen Aminosäuren zwar ausreichend für die Transduktion durch biologische Membranen, längere VP22-Sequenzabschnitte scheinen aber die Effizienz der Transduktion zu steigern. Die Spezifität der intrazellulären Aufnahme von rekombinanten VP22-IκBα-Fusionsproteinen wurde durch entsprechende Kontrollen nachgewiesen. Exogen verabreichtes IκBα wurde nicht in Zellen importiert (3.2; Abb. 13, 18, 23, 26). Interessanterweise inhibierte auch N-terminales GST die Transduktion der 22Δ159- und 22Δ267-Fusionsproteine durch biologische Membranen (3.2; Abb. 13A). GST muss die physiko-chemischen Eigenschaften der Proteine in einer Weise verändern, die einen Membrandurchtritt unmöglich macht. Wahrscheinlich besitzt die VP22-Sequenz durch die Flankierung von GST und IκBα nicht mehr die für die Transduktion erforderliche konformationelle Flexibilität (s. 4.1.3).

4.1.2 Export und Import von VP22-Fusionsproteinen sind unterschiedliche Prozesse

Während VP22-IκBα-Fusionsproteine Proteintransduktionspotential besaßen und effektiv in Zellen aufgenommen wurden, wiesen VP22-Fusionen weder mit IκBα noch mit p65ΔTAD eine transzelluläre Migration auf (3.1; Abb. 6 und 8). Der *spread* von VP22-Fusionen konnte für eine Reihe von Proteinen gezeigt werden: GFP (Elliott und O'Hare, 1999; Wybranietz *et al.*, 1999), p53 (Phelan *et al.*, 1998; Wills *et al.*, 2001), HSV-1 Thymidinkinase (TK) (Dilber *et al.*, 1999; Liu *et al.*, 2001), Cytosin-Desaminase (CD) aus *E. coli* (Wybranietz *et al.*, 2001). Voraussetzung für die Beobachtung eines *spreads* ist eine gute Expression der VP22-Proteine in den transfizierten Zellen (Fang *et al.*, 1998; Elliott und O'Hare, 1999). Sowohl die VP22-IκBα- als auch die VP22-p65ΔTAD-Konstrukte wurden stark exprimiert (3.1; Abb. 4, 6 und 8), so dass eine unzureichende Synthese der Proteine nicht der Grund für das Ausbleiben des *spreads* sein kann. Auch die Orientierung von VP22 kann eine entscheidende Rolle spielen, ob sich ein Fusionsprotein interzellulär ausbreitet. VP22-CD ist nicht in der Lage, die Produzentenzellen zu verlassen, CD-VP22 hingegen zeigt ein charakteristisches *spread*-Muster (Wybranietz *et al.*, 2001). Doch weder mit N-terminalen noch mit C-terminalen Fusionen von VP22 mit IκBα oder p65ΔTAD ließ sich eine transzelluläre Migration der Proteine mit einem proteinspezifischen (anti-IκBα, anti-p65) oder einem epitopspezifischen (anti-CMV) Antikörper detektieren.

Auffällig war die unterschiedliche Verteilung der VP22-IκBα- und der VP22-p65ΔTAD-Proteine in der Zelle. Während die IκBα-Konstrukte hauptsächlich im Cytoplasma gefunden wurden, waren die p65ΔTAD-Konstrukte exklusiv im Zellkern lokalisiert (3.1; Abb. 4, 6 und 8). Der Transport von VP22-p65ΔTAD in den Kern der transfizierten Zellen kann höchstwahrscheinlich der Kernimportsequenz in der RHD von p65ΔTAD (1.1.1) zugeschrieben werden. Die Expression des Konstrukts führt zu einer solchen Akkumulation

des Proteins in der Zelle, dass die endogenen I κ B-Proteine nicht mehr ausreichen, um VP22-p65 Δ TAD zu binden und es im Cytoplasma zurückzuhalten. Da die transzelluläre Migration von VP22-Fusionsproteinen vom Cytoplasma der Produzentenzellen ausgeht, ist es somit nicht verwunderlich, dass VP22-p65 Δ TAD keinen *spread* aufweist. Auch I κ B α hat eine Kernimportsequenz, die in der zweiten Ankyrin-Wiederholung liegt (Sachdev *et al.*, 1998). Darüberhinaus besitzt es zwei potente Kernexportsignale (Ossareh-Nazari *et al.*, 1997; Johnson *et al.*, 1999), die für eine überwiegend cytoplasmatische Verteilung der I κ B α /NF- κ B-Komplexe verantwortlich sind. Warum VP22-I κ B α -Proteine trotz vorherrschender cytoplasmatischer Lokalisation keinen *spread* zeigen, kann nur spekuliert werden. Eventuell verhindert die Wechselwirkung von I κ B α mit cytoplasmatischen Komponenten (NF- κ B, Cytoskelett, Einbindung in makromolekulare Komplexe) die Auswanderung der Proteine aus der Zelle.

Die Tatsache, dass VP22-I κ B α -Proteine spezifisch und effektiv in Zellen aufgenommen werden, jedoch keine transzelluläre Migration durchführen, beweist, dass Export und Import von VP22-Fusionsproteinen zwei voneinander unabhängige Prozesse sind. Ob ein VP22-Fusionsprotein in der Lage zu einem *spread* ist, scheint stark von der Natur des Fusionspartners abhängig zu sein.

Über die Mechanismen des Exports und Imports von VP22 und seiner Fusionsproteine ist wenig bekannt. Auch weiß man nicht, ob der Import nach exogener Zugabe nach dem gleichen Prinzip abläuft wie der Import während der transzellulären Migration. Die Internalisierung von exogen verabreichtem VP22 ist analog anderen Proteinen mit Transduktionspotential rezeptorunabhängig und erfordert außerdem ein intaktes Aktin-Cytoskelett (1.2; Elliott und O'Hare, 1997). Nach Expression bindet VP22 in der Produzentenzelle an Mikrotubuli, wodurch eine Zellteilung inhibiert wird. In Zellen, die sich bereits in der Mitose befinden, findet man hingegen eine diffuse cytoplasmatische Verteilung des Proteins, das sich schließlich an die kondensierenden Chromosomen anlagert und so gleichmäßig auf die Tochterzellen verteilt wird, wo es im Zellkern lokalisiert ist (Elliott und O'Hare, 2000; Martin *et al.*, 2002). Aufschluss über den Exportmechanismus und das Zustandekommen des charakteristischen *spread*-Musters konnte jedoch bis heute keine Studie liefern.

4.1.3 Strukturelle Aspekte der VP22-I κ B α -Fusionsproteine

Bei der Expression und Reinigung rekombinanter VP22-Fusionsproteine traten große Schwierigkeiten auf (3.2). Zunächst war es nicht möglich, p65 Δ TAD ohne VP22 in verschiedenen bakteriellen Systemen in ausreichenden Mengen zu produzieren (3.2; Abb. 9D), so dass auf die Generierung von VP22-p65 Δ TAD-Proteinen verzichtet wurde. Während die Probleme mit p65 Δ TAD unabhängig von VP22 waren, korrelierten die Schwierigkeiten, VP22-I κ B α -Proteine zu synthetisieren, eindeutig mit der Fusion an VP22 (3.2). I κ B α alleine

wurde in allen getesteten Systemen stark exprimiert und konnte leicht aufgereinigt werden (3.2 und 3.3). Komplettes VP22 oder VP22-I κ B α hingegen wurden gar nicht oder nur äußerst schwach in *E. coli* zur Expression gebracht (Daten nicht gezeigt). Es war allerdings möglich, die C-terminale Hälfte von VP22 (22 Δ 159) alleine oder als N-terminale Fusion mit I κ B α und Δ _NI κ B α (22 Δ 159-I κ B α und 22 Δ 159- Δ _NI κ B α) aus *E. coli* zu erhalten (3.2; Abb. 9-11). Wurde der VP22-Anteil auf die 34 C-terminalen Aminosäuren reduziert (22 Δ 267-I κ B α und 22 Δ 267- Δ _NI κ B α), so wurden sogar sehr starke Expressionslevel erreicht (3.2; Abb. 9). Die komplette VP22-Sequenz alleine oder als Fusion mit I κ B α (VP22-I κ B α) konnte nur über rekombinante Baculoviren in Sf-9 Insektenzellen exprimiert werden (3.2; Abb. 20). Dabei wurde VP22-I κ B α im Gegensatz zu „nacktem“ VP22 in nur geringen Mengen produziert und wies eine starke Degradation auf (3.2; Abb. 9).

Es gibt inzwischen Berichte von anderen Arbeitsgruppen, deren Versuche ebenfalls fehlschlugen, die vollständige VP22-Sequenz in Bakterien zu exprimieren (Kueltzo *et al.*, 2000; Normand *et al.*, 2001). Auch hier erwies sich die Reduzierung auf die C-terminale Hälfte als erfolgreiche Strategie zur bakteriellen Produktion und Aufreinigung des Proteins. Eine Strukturanalyse der C-terminalen Hälfte mittels Circular dichroismus, kalorimetrischen Untersuchungen und UV-Spektroskopie deckte eine hohe konformationelle Labilität des Proteins auf (Kueltzo *et al.*, 2000). Die Tertiärstruktur zeigte im Temperaturbereich von 20-60°C mehrere diskrete Strukturübergänge, die stark von anderen äußeren Bedingungen wie der Anwesenheit von zweiwertigen Kationen beeinflusst wurden. Die Wechselwirkung mit Mg²⁺, Zn²⁺ oder Oligonukleotiden führte sogar zu Veränderungen der Sekundärstruktur. Kueltzo *et al.* nehmen an, dass die strukturelle Instabilität wichtig für den Transmembrantransport des Proteins ist. Ebenso ist von Tat und ANTP bekannt, dass zumindest ihre PTDs keine definierte Struktur annehmen (Calnan *et al.*, 1991; Loret *et al.*, 1991; Derossi *et al.*, 1996). Die konformationelle Labilität könnte eine Ursache für die Schwierigkeit sein, VP22 in Bakterien zu exprimieren. Strukturelle Instabilität senkt die Löslichkeit eines Proteins und fördert gleichzeitig seinen Abbau durch bakterielle Proteasen. Die N-terminale Phosphorylierung von VP22, die nach HSV-1 Infektion beobachtet wird und wahrscheinlich für die Freisetzung des Proteins aus Viruspartikeln von Bedeutung ist (Morrison *et al.*, 1998; Elliott *et al.*, 1999), könnte wichtig für die strukturelle Stabilität des freien Proteins sein. Dass diese Phosphorylierung prinzipiell in Sf-9 Insektenzellen posttranslational erfolgen kann, würde eine Erklärung liefern, warum die komplette VP22-Sequenz in Sf-9 Insektenzellen gut, jedoch überhaupt nicht in Bakterien exprimiert wird, die zu dieser Modifikation nicht fähig sind.

Des Weiteren könnte die instabile Tertiärstruktur für die hohen Verluste während der Reinigung der verschiedenen VP22-I κ B α -Proteine verantwortlich sein. Bei hohen lokalen Proteinkonzentrationen, wie sie während der Bindung an Säulenmaterial auftritt, oder auch bei der Dialyse gegen einen Puffer mit geringerer Ionenstärke fördert eine fluktuierende Tertiärstruktur durch die vermehrte Exponierung hydrophober Bereiche ein Aggregieren und denaturierendes Ausfallen der Proteine. Zusätzliche Komplikation entsteht dadurch, dass

VP22 und ebenfalls seine C-terminale Hälfte viele Arginin- und Lysinreste enthalten, die bei physiologischem pH-Wert für eine starke positive Gesamtladung des Proteins sorgen. I κ B α hingegen besitzt sehr viele saure Aminosäuren (Aspartat und Glutamat), die dem Protein eine starke negative Gesamtladung verleihen, so dass VP22-I κ B α einen Dipolcharakter hat. Die konformationelle Flexibilität von VP22 könnte dazu führen, dass Bereiche des Moleküls über ionische Wechselwirkung mit negativ geladenen Bereichen von I κ B α interagieren, wodurch an anderen Stellen von VP22 zumindest temporär vermehrt hydrophobe Aminosäurereste exponiert würden. Diese Hypothese wird durch die Beobachtung gestützt, dass im bacuoviralen System VP22 alleine deutlich besser und stabiler exprimiert wurde als VP22-I κ B α (3.2; Abb. 20C). Auch würde sie die breite, unscharfe Elution von VP22-I κ B α von der Mono-Q-Säule erklären (3.2; Abb. 22). Die überzeugendsten Anhaltspunkte lieferten jedoch die *in vitro*-Analysen der Integrität der aufgereinigten Proteine mittels EMSA. VP22-I κ B α und 22 Δ 159-I κ B α erwiesen sich *in vitro* als genauso potent, die Bindung von NF- κ B an sein Erkennungsmotiv zu inhibieren, wie I κ B α mit oder ohne (His)₆-Epitop und GST-I κ B α (3.2; Abb. 15 und 24). Damit wurde die korrekte Faltung und funktionelle Integrität des I κ B α -Anteils in den Fusionsproteinen nachgewiesen. 22 Δ 159- Δ _NI κ B α hingegen war ein wesentlich schwächerer Hemmer der DNA-Bindung von NF- κ B in den *in vitro*-Experimenten und es musste eine deutlich größere Proteinmenge eingesetzt werden, um einen Hemmeffekt zu beobachten (3.2; Abb. 15). Dass die schwächere Inhibition nicht prinzipiell am Fehlen der N-terminalen Domäne von I κ B α liegen kann, zeigt die Tatsache, dass in eukaryontischen Zellen exprimiertes VP22- Δ _NI κ B α sehr wohl in der Lage war, NF- κ B zu inhibieren (3.2; Abb. 5B). Vielmehr ist es wahrscheinlich, dass es durch die konformationelle Labilität von VP22 zu fluktuierenden Konformationszuständen kommt, in denen Bereiche von VP22 mit den Ankyrin-Wiederholungen von Δ _NI κ B α über elektrostatische Wechselwirkung interagieren und so die Bindung von Δ _NI κ B α an NF- κ B stören. Die N-terminale Domäne von I κ B α würde dann als Abstandhalter wirken, der die Ankyrin-Wiederholungen von den flexiblen Bereichen von 22 Δ 159 räumlich trennt.

Neben den strukturellen Betrachtungen zur Erklärung der Probleme während der Expression und Reinigung der rekombinanten VP22-I κ B α -Fusionsproteine kann die mangelnde Expression der kompletten VP22-Sequenz in Bakterien ebenso andere Ursachen haben. VP22 ist ein Protein viralen Ursprungs. Es könnten Sequenzmotive im N-terminalen Bereich des Moleküls vorhanden sein, die bereits während der Translation von bakteriellen Proteasen im Rahmen einer Abwehrreaktion erkannt und geschnitten werden. Auch beim Vergleich der unterschiedlichen Produktion von VP22 und VP22-I κ B α in Sf-9 Zellen ist zu beachten, dass generell rekombinante Proteine um so schlechter exprimiert werden, je größer sie sind.

4.1.4 Inhibition von NF- κ B durch VP22-I κ B α -Fusionsproteine

Trotz einer effektiven intrazellulären Aufnahme erwiesen sich sämtliche bakteriell exprimierte 22 Δ 159- oder 22 Δ 267-I κ B α -Proteine als unfähig, NF- κ B in der Zelle zu inhibieren (3.2; Abb. 14 und 16B). Für die 22 Δ 267-Fusionsproteine und Proteine mit Δ_N I κ B α konnte dies mit einer mangelnden Hemmung der DNA-Bindung von NF- κ B *in vitro* korreliert werden (3.2; Abb. 15). 22 Δ 159-I κ B α hingegen war ein potenter Inhibitor *in vitro*, besaß aber dennoch keinen Effekt nach Import in die Zellen (3.2; Abb. 15B und 16B). Die Analyse des Imports von 22 Δ 159-I κ B α mittels Western-Blot zeigte, dass die intrazelluläre Konzentration des Proteins höher war als die von endogenem I κ B α (3.2; Abb. 16A). Eine genauere Untersuchung der intrazellulären Verteilung durch indirekte Immunfluoreszenzfärbung deckte die Akkumulation des Proteins in granulären Strukturen unterschiedlicher Größe auf (3.2; Abb. 17). Das scheinbar ausschließlich in diesen Strukturen angehäuften Protein war offensichtlich nicht in der Lage, mit NF- κ B zu wechselwirken. Es wurde beschrieben, dass sich bei Inkubation der C-terminalen Hälfte von VP22 mit Oligonukleotiden sphärische Partikel aus den beiden Komponenten ausbilden, die nach exogener Zugabe in das Cytoplasma von Zellen aufgenommen werden (Normand *et al.*, 2001). Fluoreszenzaufnahmen von Zellen mit diesen Partikeln weisen eine verblüffende Ähnlichkeit zu den in Abbildung 17 präsentierten Aufnahmen der Zellen nach Internalisierung von 22 Δ 159-I κ B α auf. Normand *et al.* nehmen an, dass die Partikel aus Aggregaten der C-terminalen Hälfte von VP22 mit den Oligonukleotiden bestehen, die über elektrostatische Wechselwirkung zusammengehalten werden. Es kann nicht ausgeschlossen werden, dass es sich bei den granulären Strukturen, die nach Import von 22 Δ 159-I κ B α beobachtet wurden, um membranumhüllte Vesikel handelt. Aufgrund des Dipolcharakters des Fusionsproteins erscheint es allerdings sehr wahrscheinlich, dass die Granula, in Analogie zu den VP22/Oligonukleotid-Komplexen, Proteinaggregate von 22 Δ 159-I κ B α sind, die durch elektrostatische Wechselwirkung zustande gekommen sind. Ob sich die 22 Δ 159-I κ B α -Komplexe entsprechend den VP22/Oligonukleotid-Komplexen bereits vor oder erst nach dem Transport in die Zellen ausbilden, ist nicht bekannt. Durch intensive Lichtbestrahlung konnte eine Auflösung der VP22/Oligonukleotid-Aggregate und damit eine gleichmäßige Verteilung des Oligonukleotids in der Zelle erreicht werden, was aber die Kopplung des Oligonukleotids mit einem Chromophor voraussetzte (Normand *et al.*, 2001).

Im Gegensatz zu 22 Δ 159-I κ B α bewirkten in 293 Zellen exprimiertes, unaufgereinigtes und baculoviral exprimiertes, hochreines VP22-I κ B α eine effektive Inhibition von NF- κ B nach spezifischer intrazellulärer Aufnahme (3.2; Abb. 19, 25-27). Auch mit diesen I κ B α -Proteinen, die mit der kompletten VP22-Sequenz fusioniert worden waren, wurde eine Aggregatbildung nach Import in Zellen mittels indirekter Immunfluoreszenzfärbung beobachtet (3.2; Abb. 18, 19 und 23). Die granulären Strukturen waren jedoch von weniger klar definierter Größe und hatten ein eher amorphes Erscheinungsbild. Über die gesamte Zelle wurde eine erhöhte Fluoreszenzintensität detektiert, was anzeigt, dass zumindest ein Teil der importierten VP22-

I κ B α -Proteine in freier, unkomplexierter Form vorlag, das wahrscheinlich für die Wechselwirkung mit NF- κ B und die beobachtete Inhibition des Transkriptionsfaktors verantwortlich war. Warum die Fusion aus I κ B α mit der vollständigen VP22-Sequenz eine geringere Neigung zur Aggregatbildung hatte als 22 Δ 159-I κ B α , ist nicht klar. Vielleicht könnte auch hier eine posttranslationale Phosphorylierung von VP22 in 293 und Sf-9 Zellen eine Rolle spielen, die die Struktur des Moleküls stabilisiert und die positive Gesamtladung des VP22-Anteils abschwächt. Unterschiedlich stark phosphorylierte Populationen von VP22-I κ B α hätten demnach eine unterschiedliche Tendenz zur Aggregatbildung.

4.1.5 Perspektiven des VP22-Systems zur Inhibition von NF- κ B

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit gelang erstmals die Aufreinigung des vollständigen VP22-Proteins sowie eines VP22-I κ B α -Fusionsproteins. Die exogene Zugabe von bereits 3 μ g von rekombinantem VP22-I κ B α zu Zellen in einer 35 mm Kulturschale bewirkte nach spezifischer intrazellulärer Aufnahme des Proteins eine beachtliche Inhibition des Transkriptionsfaktors NF- κ B in den Zellen (3.2; Abb. 25 und 26). Sowohl die basale Aktivierung (Abb. 25) als auch die TNF α -induzierte Aktivierung von NF- κ B (Abb. 25 und 26) wurden durch importiertes VP22-I κ B α stark gehemmt. Trotz der effektiven Internalisierung des Fusionsproteins war dennoch keine vollständige Inhibition des Transkriptionsfaktors zu erreichen (Abb. 25 und 26), was auf die Tendenz von VP22-I κ B α zur Aggregatbildung zurückgeführt werden kann, die den intrazellulären Pool an freiem, zugänglichem Protein reduziert (4.1.4). Durch Erhöhung der Dosis von 3 μ g auf 10 μ g gelang es, eine nahezu komplette Inhibition der TNF α induzierten Aktivierung von NF- κ B zu erzielen (3.2; Abb. 27A). In den Lysaten von Kontrollzellen wurden allerdings auch geringe Mengen von rekombinantem I κ B α detektiert (Abb. 27B), das ebenfalls zu einer, wenngleich schwachen, Hemmung der DNA-Bindung von NF- κ B führte. Die Zellen waren nach der Ernte offensichtlich nicht stringent genug gewaschen worden, was die Detektion von Resten unspezifisch assoziierter Proteine zur Folge hatte. Auch wenn es sich nur um einen geringen Anteil des VP22-I κ B α -Effektes handelt, so ist damit das Ergebnis des Experimentes trotzdem mit Vorsicht zu interpretieren. Importstudien mit bakteriell exprimiertem 22 Δ 159-I κ B α , das wahrscheinlich aufgrund deutlich stärkerer Neigung zur Bildung von Aggregaten keinen inhibitorischen Effekt *in vivo* hatte, deuteten an, dass eine Erhöhung der Dosis des verabreichten Proteins zwar zu einem erhöhten Level an intrazellulär aufgenommenem Protein führte, gleichzeitig jedoch die Aggregatbildung in der Zelle förderte (3.2; Abb. 17). Aufgrund der sehr geringen Mengen an aufgereinigtem, baculoviral exprimiertem VP22-I κ B α konnten hier keine detaillierteren Untersuchungen vorgenommen werden. Eine Unterbindung oder zumindest eine Hemmung der intrazellulären Aggregatbildung könnte die inhibitorische Wirkung von VP22-I κ B α drastisch steigern. Wie dies zu erreichen wäre, ist bis jetzt unklar. Die Verwendung von Detergentien scheidet aus, da sie durch Permeabilisierung der Membran

Importartefakte verursachen würden. Andere Substanzen, wie DMSO, sind toxisch für die Zellen. Eventuell bietet der Zusatz bestimmter Kationen (z. B. Mg^{2+}) oder generell eine Veränderung der Ionenstärke eine Möglichkeit, doch auch dieser Ansatz könnte sich nachteilig auf die Zellviabilität auswirken.

Bisher konnten einige Proteine durch das VP22-System erfolgreich unter Erhalt ihrer biologischen Aktivität in Zellen eingebracht werden. Dabei wurde überwiegend die Fähigkeit der VP22-Fusionsproteine zur transzellulären Migration ausgenutzt. GFP (Elliott und O'Hare, 1999; Wybranietz *et al.*, 1999), p53 (Phelan *et al.*, 1998; Wills *et al.*, 2001), HSV-1 Thymidinkinase (TK) (Dilber *et al.*, 1999; Liu *et al.*, 2001), Cytosin-Desaminase (CD) aus *E. coli* (Wybranietz *et al.*, 2001), Flp Rekombinase (Bennet und Dalby, 2002) sowie verschiedene Modellantigene (Cheng *et al.*, 2001; Hung *et al.*, 2001; Oliveira *et al.*, 2001) zeigten als VP22-Fusionsproteine den charakteristischen *spread*. Das einzige Beispiel in der Literatur für den intrazellulären Import eines aufgereinigten VP22-Proteins nach exogener Zugabe ist bakteriell exprimierte T7 RNA Polymerase fusioniert mit der C-terminalen Hälfte von VP22 (Bennet und Dalby, 2002). Die biologische Aktivität der angeführten Proteine wurde teilweise direkt (enzymatische Aktivität, Reporterstudien), teilweise aber auch nur indirekt (Apoptoseinduktion durch p53, Immunantwort durch Modellantigene) bestimmt. Allen Proteinen ist jedoch gemeinsam, dass im Gegensatz zu $I\kappa B\alpha$ bereits relativ geringe intrazelluläre Mengen ausreichen, um eine biologische Aktivität zu detektieren. So ist der Nachweis einer enzymatischen Aktivität ungleich sensitiver als die Messung der Inhibition von NF- κ B durch $I\kappa B\alpha$, da $I\kappa B\alpha$ direkt in einem 1:1 Verhältnis mit endogenem NF- κ B wechselwirken muss. Trotz dieses Dosis-Wirkungsnachteils und der Aggregatbildung von VP22- $I\kappa B\alpha$ konnte eine starke inhibitorische Aktivität des Proteins beobachtet werden.

Der wirklich limitierende Faktor in der Anwendbarkeit von VP22- $I\kappa B\alpha$ war die Schwierigkeit, das Protein in ausreichender Menge und Konzentration zu erhalten. VP22- $I\kappa B\alpha$ wurde generell nicht in bakteriellen Systemen exprimiert. Eine Aufreinigung aus transient transfizierten 293 Zellen sowie aus transient und stabil transfizierten Sf-9 Insektenzellen war wegen zu geringer Expression des Proteins nicht möglich. Einzig die baculovirale Expression in Sf-9 Zellen bot die Chance zum Erhalt von VP22- $I\kappa B\alpha$. Die geringen Ausbeuten an aufgereinigtem VP22- $I\kappa B\alpha$ standen allerdings in keinem Verhältnis zu dem dazu notwendigen, immensen Aufwand und erlaubten die Durchführung nur weniger Experimente. Eine Alternative könnte die Expression in Hefezellen bieten. Mit Hinblick auf die physiko-chemischen Eigenschaften des Proteins (4.1.3) scheint die Expression und Aufreinigung großer Mengen VP22- $I\kappa B\alpha$ jedoch kein triviales Unterfangen zu sein. Dabei wäre es interessant, das Protein auf seine Wirksamkeit in Entzündungs- oder Tumormodellen in Tieren zu testen. Es könnte die Frage beantwortet werden, ob die gerichtete Aufnahme von VP22- $I\kappa B\alpha$ in lebendes Gewebe genauso effizient wie in kultivierte Zellen vonstatten geht und ob eine Hemmung von NF- κ B erreicht werden kann, die ausreicht, um einen antiinflammatorischen Effekt oder eine Wirkungsverstärkung von Chemotherapeutika zu detektieren.

4.1.6 Das Importpeptid Pep-1

Das synthetische Importpeptid Pep-1 wurde von Morris *et al.* beschrieben (3.3; Abb. 28; Morris *et al.*, 2001) und ist inzwischen von der Firma Active Motif unter dem Produktnamen Chariot™ erhältlich. Mit Hilfe von Pep-1 konnte die spezifische intrazelluläre Aufnahme von Peptiden, Proteinen (β -Galactosidase) und Antikörpern erreicht werden. Pep-1 besitzt gegenüber anderen Proteinen und Peptiden mit Proteintransduktionseigenschaft den Vorteil, dass kein Fusionskonstrukt hergestellt werden muss. Pep-1 und das einzuliefernde Protein bilden nicht-kovalente Komplexe, die nach Import in die Zellen dissoziieren. Da ein Großteil der Probleme mit VP22-I κ B α höchstwahrscheinlich auf die Fusion der beiden unterschiedlichen Komponenten zurückzuführen war (4.1.3), bot sich durch Pep-1 die Möglichkeit, die durch die Fusion entstandenen Nachteile zu umgehen. Komplexe aus bakteriell exprimiertem I κ B α und Pep-1 wurden tatsächlich sehr effektiv von Zellen internalisiert, zeigten aber im Gegensatz zu VP22-I κ B α keine NF- κ B inhibitorische Aktivität (3.3; Abb. 29). Auf eine genauere Analyse dieses Ergebnisses wurde verzichtet. Es ist allerdings bekannt, dass sich auch bei Anwendung von Pep-1, in Abhängigkeit der eingesetzten Konzentration des Importpeptids und der Natur des zu importierenden Proteins, größere Aggregate bilden können, die analog zu VP22-I κ B α die Konzentration an freiem löslichem Protein in der Zelle drastisch senken (Information der Firma Active Motif). Selbst der in diesem Fall empfohlene Einsatz von DMSO (Dr. Jörg Plümpe, Firma Active Motif, persönliche Mitteilung) brachte weder eine Steigerung des Imports noch eine Verbesserung des Hemmeffektes auf die NF- κ B-Aktivität (3.3; Abb. 29A). Somit war Pep-1 keine Alternative zu dem VP22-I κ B α -Fusionsprotein.

4.1.7 Alternative Strategien zur Inhibition von NF- κ B

In bestimmten pathologischen Prozessen wie z. B. chronischen Entzündungen und vielen malignen Erkrankungen findet man eine überschießende, konstitutive Aktivierung des normalerweise streng regulierten NF- κ B. Die daraus erfolgende Veränderung des Genexpressionsprofils in den betroffenen Geweben trägt entscheidend zum Krankheitsbild bei (1.1.7). Die Inhibition von NF- κ B in diesen Prozessen ist der Angriffspunkt vieler therapeutischer Strategien. Aufgrund des komplexen Signalweges, der zur Aktivierung des Transkriptionsfaktors führt, sind prinzipiell mehrere Ansatzpunkte zur Intervention möglich (1.1). Viele der zur Behandlung chronischer Entzündungen eingesetzten Substanzen inhibieren NF- κ B. Glucocorticoide hemmen die transkriptionelle Aktivität von NF- κ B, wahrscheinlich durch direkte Wechselwirkung des Glucocorticoidrezeptors mit p65 (Makarov, 2000). Nicht steroidale antiinflammatorische Substanzen (NSAIDs) wie Aspirin, und Antioxidantien wie Vitamin C, E, N-Acetylcystein (NAC) oder Pyrollidindithiocarbamat (PDTC) greifen weiter stromaufwärts in den Aktivierungsweg von NF- κ B ein (Epinat und Gilmore, 1999). Für Aspirin konnte eine direkte Inhibition von IKK β gezeigt werden (Yin *et*

al., 1998). Auch andere zur Behandlung von chronischen Entzündungen oder Tumoren verwendete Substanzen wie Sulfasalazin, Methotrexat oder Curcumin inhibieren die Aktivität des IKK-Komplexes (zusammengefasst bei Makarov, 2000; Karin *et al.*, 2002). Alle angeführten Substanzen sind jedoch keine spezifischen NF- κ B-Inhibitoren, sondern haben weitere, zusätzliche Angriffspunkte in der Zelle. Außerdem hemmen sie NF- κ B häufig (in Abhängigkeit ihrer Applikation) nicht nur in betroffenen Geweben, sondern ebenfalls an anderer Stelle im Organismus, was aufgrund der Bedeutung des Transkriptionsfaktors für viele physiologische Prozesse zu unerwünschten Nebenwirkungen führen kann. Darüber hinaus ist nicht eindeutig geklärt, ob der IKK-Komplex neben den I κ B-Proteinen noch andere Substrate phosphoryliert und/oder reguliert, so dass ein Eingriff an dieser Stelle auch Nebeneffekte zur Folge haben könnte.

Einen spezifischeren Ansatz stellt die Inhibition von NF- κ B durch Oligonukleotide dar. Nach Verabreichung von p65/RelA-*Antisense*-Konstrukten wurde eine Verminderung der Symptome in einem Mausmodell von chronisch entzündlichen Darmerkrankungen beobachtet (Neurath *et al.*, 1996). In einer alternativen Strategie wurden *Decoy*-Oligonukleotide angewendet, die mehrere NF- κ B-Bindungsstellen (κ B-Motive) enthielten. Mit diesen konnte in einem Kollagen induzierten Arthritis-Modell in Ratten die Produktion von IL-1 und TNF α in den Gelenken inhibiert und eine Linderung der Krankheitssymptome erreicht werden (Tomita *et al.*, 1999). Beide Gentherapie-Ansätze führten allerdings nur zu einer teilweisen Verbesserung der Krankheitsbilder, was in der generell mangelnden Effizienz und sogar Reproduzierbarkeit des intrazellulären Imports von Oligonukleotiden *in vivo* begründet ist.

Die Proteintransduktionstechnologie hat inzwischen ihre Effizienz in verschiedenen *in vivo*-Tiermodellen unter Beweis gestellt (4.2). Es existiert sogar ein Bericht, in dem die Inhibition von NF- κ B durch intrazelluläre Aufnahme eines Peptids mittels Proteintransduktion beschrieben wurde (May *et al.*, 2000). Bei dem 11 Aminosäuren umfassenden Peptid handelt es sich um ein Sequenzstück aus der N-terminalen Region von IKK β , das essentiell für die Wechselwirkung mit IKK γ (NEMO) ist. Durch Einschleusung des Peptids in Zellen durch N-terminale Fusion mit der PTD aus ANTP (1.2) wurde die Bildung des IKK-Komplexes unterbunden und somit die TNF α induzierte NF- κ B-Aktivierung inhibiert. In zwei Mausmodellen für akute Entzündungen (PMA induziertes Ohr-Ödem und Zymosan induzierte Peritonitis) erwies sich der Einsatz des Peptids als genauso wirksam wie der Einsatz von Dexamethason (May *et al.*, 2000). Genau wie bei vielen der oben aufgeführten Substanzen greift dieser Ansatz jedoch schon auf der Stufe des IKK-Komplexes ein, wodurch seine Spezifität aus den bereits genannten Gründen vermindert werden könnte.

Ein spezifischer Eingriff zur Inhibition von NF- κ B müsste nach dem heutigen Kenntnisstand direkt an den NF- κ B/Rel-Proteinen oder an den NF- κ B/I κ B-Komplexen erfolgen, weshalb zu Beginn der vorliegenden Arbeit I κ B α und p65 als Ziele ausgewählt wurden. Eine Beschränkung oder Reduzierung des Zielproteins (NF- κ B- oder I κ B-Protein) auf eine ausgewählte Peptidsequenz, die essentiell für die Bindung von NF- κ B an DNA oder I κ B-

Proteine ist, scheint eine attraktive Alternative darzustellen, um die beschriebenen Probleme, die mit den vollständigen Sequenzen auftraten, zu umgehen. Dies dürfte allerdings aufgrund der extensiven, ausgedehnten Wechselwirkungen von NF- κ B mit I κ B-Proteinen (1.1.2) oder von NF- κ B mit DNA (1.1.1) ein schwieriges Unterfangen sein. Erfolgsversprechender erscheint die Fusion mit der PTD von Tat (1.2; Tab. 1). Die 301 Aminosäuren von VP22 würden durch die 11 Aminosäuren umfassende Tat-PTD ersetzt. Es sei daran erinnert, dass die Fusionen von I κ B α mit den 34 C-terminalen Aminosäuren (22 Δ 267) deutlich besser exprimiert wurden als die Konstrukte mit längeren VP22-Sequenzen (3.2; Abb. 9). Mit Tat-PDT-Fusionsproteinen wurden ausgezeichnete Ergebnisse erzielt (4.2).

4.2 Allgemeine Perspektiven und Grenzen der Proteintransduktionstechnologie

Die Proteintransduktionstechnologie hat in den letzten Jahren mit der Entdeckung von ANTP, Tat und VP22, und ihrer außergewöhnlichen Fähigkeit, durch biologische Membranen zu translozieren, großes Interesse erfahren. Obwohl sie ihr Potential bereits jetzt in einer Vielzahl von Zellkultur- und Tiermodellexperimenten unter Beweis gestellt hat, steckt die Proteintransduktionstechnologie noch in den Kinderschuhen und es verbleiben noch einige Fragen besonders hinsichtlich ihrer universellen Einsetzbarkeit zu klären.

Die Anwendbarkeit von ANTP und der von ihm abgeleiteten Penetratine (1.2) scheint auf den intrazellulären Import von Peptiden beschränkt zu sein, da die Transduktionseffizienz mit größeren Proteinen drastisch abnimmt (Schwarze und Dowdy, 2000). In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass der Erfolg des VP22-Systems stark von der physikochemischen Natur des Fusionspartners abhängig ist. Es wird häufig versucht, den *spread* von VP22-Fusionsproteinen mit klassischen Gentherapieansätzen zu kombinieren (virale Vektoren, die die genetische Information für VP22-Fusionsproteine beherbergen), um auf diese Weise die Effizienz des viral vermittelten Gentransfers zu steigern. Diese Strategie ist jedoch nicht universell einsetzbar, da einige VP22-Proteine offensichtlich nicht zur transzellulären Migration fähig sind.

Es gibt Stimmen, die behaupten, dass es sich bei vielen der beobachteten Proteintransduktionen um Artefakte handelt. Einer der ersten Hinweise in diese Richtung war die Tatsache, dass der *spread* von VP22-GFP-Fusionsproteinen nicht in lebenden Zellen, sondern nur nach Methanol-Fixierung der Zellen mittels indirekter Immunfluoreszenzfärbung detektiert werden konnte (Fang *et al.*, 1998). Es wurde in einer anderen Studie gezeigt, dass der *spread* von VP22-GFP zumindest nicht abhängig von der Fixierungsmethode ist (Brewis *et al.*, 2000). Die Autoren argumentierten, dass in lebenden Zellen keine transzelluläre Migration von VP22-GFP zu sehen ist, läge an der zu geringen Fluoreszenzintensität von GFP in Zellen unter Kulturmedium. Doch auch andere Gruppen artikulierten Zweifel an der Spezifität des *spreads* von VP22 und der tatsächlichen Transduktion von VP22, ANTP und Tat durch biologische Membranen (Lundberg und Johansson, 2001; Lundberg und Johansson,

2002). Die Wechselwirkung der basischen Proteine mit Membranen sei eher unspezifischer Natur und der mit indirekter Immunfluoreszenzfärbung beobachtete intrazelluläre Eintransport sowie der *spread* von VP22 sei ein Artefakt, das durch Fixierung und Permeabilisierung der Zellen verursacht werde. Dieser Kritik steht eine wachsende Zahl experimenteller Gegenbeweise gegenüber. Nicht zuletzt in der vorliegenden Arbeit wurde die Aufnahme von VP22-I κ B α auch durch andere Methoden (Western-Blot) und darüber hinaus die biologische Aktivität des Proteins nach Import *in* den Zellen nachgewiesen. Der *spread* von VP22-GFP konnte ebenfalls mittels FACS-Analyse an *lebenden* Zellen gezeigt werden (Wybranietz *et al.*, 1999). Es existieren inzwischen viele Publikationen, die sowohl in Zellkultur als auch in Tiermodellen direkt oder indirekt die biologische Aktivität von durch VP22, ANTP und Tat importierten Proteinen und Peptiden gemessen haben, wofür der *spezifische intrazelluläre* Eintransport der Proteine absolute Voraussetzung war.

Eine weitere Einschränkung für den Einsatz der Proteintransduktionstechnologie *in vivo* für therapeutische Zwecke könnte das Auslösen einer Immunantwort durch VP22-, ANTP- oder Tat-Sequenzen sein. Bisher ist dieses Problem kaum untersucht worden. Die tägliche Verabreichung eines Tat-GFP-Fusionsproteins über 14 Tage bewirkte keine Immunreaktion in Mäusen (Schwarze und Dowdy, 2000). Nach intraperitonealer Gabe von VP22 exprimierenden Zellen in immunkompetente Mäuse konnte keine CTL (cytotoxische T-Lymphocyten)-Antwort detektiert werden (Wolfgang Wybranietz, persönliche Mitteilung). Durch die Beschränkung auf die PTDs der Proteine oder die Generierung synthetischer Peptide mit Transduktionspotential kann die Gefahr einer unerwünschten Immunantwort sicherlich minimiert werden; weitere experimentelle Daten müssen jedoch in Zukunft darüber Aufschluss geben.

Aufgrund der genannten Beschränkung auf Peptide hat das ANTP-System nicht so große Beachtung erfahren wie Tat und VP22. Bei dem intrazellulären Import kompletter Proteine unter Erhalt ihrer biologischen Aktivität wurden mit Tat und VP22 bemerkenswerte Erfolge erzielt. Wie bereits angeführt, gehören zu den Proteinen, bei denen durch Fusion mit VP22 ein *spread* unter Erhalt ihrer Aktivität beobachtet wurde, GFP, p53, HSV-1 Thymidinkinase (TK), Cytosin-Desaminase (CD) aus *E. coli*, Flp Rekombinase, das große T-Antigen aus SV-40 (Derer *et al.*, 2002) sowie verschiedene Modellantigene (4.1.5). Transkriptionell aktive T7 RNA-Polymerase, fusioniert mit der C-terminalen Hälfte von VP22, wurde direkt nach exogener Zugabe in Zellen aufgenommen (Bennet und Dalby, 2002). In einem Maus-Tumormodell konnte durch den Einsatz von rekombinanten Adenoviren, die p53-VP22 exprimierten, eine deutliche Steigerung der Apoptoserate von Tumorzellen gegenüber p53 alleine festgestellt werden (Wills *et al.*, 2001). Der verbesserte Anti-Tumoreffekt konnte mit einer im Vergleich zu p53 größeren, weiterreichenden Verteilung von p53-VP22 im Tumorgewebe korreliert werden. Die Wirksamkeit und Effizienz des VP22-Systems *in vivo* wurde auch durch die Versuche mit Modellantigenen unter Beweis gestellt, in denen durch *spread* der VP22-Antigen-Fusionsproteine eine dramatische Steigerung der antigen-

spezifischen Immunantwort erreicht wurde (Cheng *et al.*, 2001; Hung *et al.*, 2001; Oliveira *et al.*, 2001).

Als Tat-Fusionsproteine konnten u.a. GFP (Caron *et al.*, 2001), Cre Rekombinase (Peitz *et al.*, 2002), Katalase (Jin *et al.*, 2001), p27^{Kip1} (Nagahara *et al.*, 1998), Glucuronidase (Xia *et al.*, 2001), Glutamat-Dehydrogenase (Yoon *et al.*, 2002) und Caspase-3 (Harada *et al.*, 2002) in Zellen importiert werden. Ein Fusionsprotein aus der Tat-PTD (Aminosäuren 47-57, s. 1.2 und Tab. 1) und der β -Galactosidase ließ sich im Mausmodell nach intraperitonealer Injektion in allen Geweben und sogar im Gehirn detektieren bei nachweislich intakter Blut-Hirn-Schranke (Schwarze *et al.*, 1999). Normalerweise ist eine effektive Aufnahme von therapeutischen Substanzen, Peptiden und Peptidomimetika in das Gehirn auf Moleküle mit einer Größe bis etwa 600 Dalton beschränkt und die Blut-Hirn-Schranke stellt für viele Substanzen eine undurchdringliche Barriere dar (Egleton und Davis, 1997, van de Waterbeemd *et al.*, 1998). Dass durch die Tat-PTD β -Galactosidase mit einem Molekulargewicht von 120 kD diese Barriere durchschreiten kann, verdeutlicht die Möglichkeiten, die in der Proteintransduktionstechnologie stecken. Interessant ist die Beobachtung, dass Fusionsproteine mit der Tat-PTD häufig ein größeres Transduktionspotential besitzen, wenn sie denaturierend aufgereinigt wurden. Da die denaturierten Proteine jedoch in der Zelle ihre biologische Aktivität entfalten, wird angenommen, dass sie nach der Aufnahme mit Hilfe von Chaperonen in ihre native Konformation zurückgefaltet werden (Nagahara *et al.*, 1998). Auch mit dem Tat-PTD-Glucuronidase-Fusionskonstrukt wurde in Mäusen mit Mucopolysaccharidosis Typ VII sehr vielversprechende Ergebnisse erhalten (Xia *et al.*, 2001; Elliger *et al.*, 2002).

Trotz der rasanten Entwicklung in den letzten Jahren und der erzielten Erfolge müssen in Zukunft weitere Experimente, vor allem in Tiermodellen, über das tatsächliche Potential der Proteintransduktionstechnologie Aufschluss geben.

5 Zusammenfassung

Der Transkriptionsfaktor NF- κ B spielt eine wichtige Rolle im Immunsystem und in der Stressantwort. NF- κ B wird in den meisten Geweben in einem inaktiven Zustand gehalten durch Wechselwirkung mit I κ B-Proteinen, von denen das prominenteste und wichtigste I κ B α ist. Die vorübergehende, zeitlich begrenzte Induktion des Transkriptionsfaktors ist ein komplexer, feinregulierter Prozess, der es dem Organismus ermöglicht, gezielt auf eine Vielzahl von unterschiedlichen stressinduzierenden Stimuli zu reagieren. Eine ungewollte, konstitutive Aktivierung von NF- κ B ist eine Begleiterscheinung vieler schwerwiegender Erkrankungen, zu denen chronische Entzündungen und Krebs gehören. Dabei trägt die permanente Aktivierung von NF- κ B entscheidend zur Progression der Erkrankungen bei.

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde die Anwendbarkeit einer neuen Strategie zur Inhibition von NF- κ B untersucht. Es wurde getestet, ob mit Hilfe der Proteintransduktionstechnologie Proteine in Zellen eingeschleust werden können, die die Aktivität von NF- κ B hemmen. Als Kandidaten wurden das I κ B-Protein I κ B α und das NF- κ B/Rel-Protein p65 ohne Transaktivierungsdomäne (p65 Δ TAD) gewählt. Von I κ B α wurden auch Konstrukte kloniert, denen die N-terminale, regulatorische Domäne fehlte (Δ _NI κ B α). Δ _NI κ B α ist resistent gegenüber den Abbausignalen durch NF- κ B aktivierende Stimuli und stellt damit eine „Superrepressor“-Form von I κ B α dar. Die I κ B α - und p65 Δ TAD-Proteine sollten durch Fusion mit dem Herpes simplex-Virus Typ-1 (HSV-1)-Strukturprotein VP22 in Zellen eingeschleust werden.

VP22 und VP22-Fusionsproteine werden nicht nur wie ANTP und Tat nach exogener Zugabe spezifisch intrazellulär aufgenommen, sondern sind ebenfalls zu einer transzellulären Migration (*spread*) fähig. Hierbei wandern die Proteine aus transfizierten Produzentenzellen in nicht-transfizierte Zellen ein, wodurch eine annähernd 100%ige Transfektionseffizienz erreicht werden kann. Somit bietet VP22 gegenüber anderen Proteinen mit PTDs eine zusätzliche Anwendungsmöglichkeit.

Die Expression von I κ B α - und p65 Δ TAD-Konstrukten, die N- oder C-terminal mit VP22 fusioniert worden waren, in eukaryontischen Zellen führte zur Produktion großer Mengen rekombinanter Proteine. Alle Konstrukte waren funktionell aktiv und inhibierten die TNF α induzierte Aktivierung von NF- κ B vollständig. Es konnte jedoch weder mit den VP22-I κ B α - noch mit den VP22-p65 Δ TAD-Proteinen ein *spread* beobachtet werden, so dass für diesen Ansatz die VP22-Fusionsproteine keinen Vorteil gegenüber I κ B α und p65 Δ TAD alleine hatten. Exprimiertes VP22-p65 Δ TAD war wie p65 Δ TAD fast exklusiv im Zellkern zu finden, wodurch nicht genügend cytoplasmatisches Protein für einen Export zur Verfügung stand. Die VP22-I κ B α -Konstrukte hingegen waren überwiegend cytoplasmatisch lokalisiert, wiesen aber dennoch keine transzelluläre Migration auf.

Die Inkubation von Zellen mit ungereinigtem Lysat von 293 Zellen, die VP22-I κ B α exprimierten, führte zu einer effizienten und spezifischen intrazellulären Aufnahme des rekombinanten Proteins, was die Inhibition der TNF α induzierten Aktivierung von NF- κ B zur Folge hatte. Dass VP22-I κ B α nicht zum interzellulären *spread* in der Lage ist, aber nach exogener Zugabe in Zellen importiert wird, bewies, dass Export und Import von VP22-Fusionsproteinen zwei voneinander unabhängige Prozesse sind.

Der Versuch, VP22-I κ B α und VP22-p65 Δ TAD in aufgereinigter Form zu erhalten, erwies sich als schwierig. In verschiedenen bakteriellen Systemen konnte p65 Δ TAD alleine im Gegensatz zu I κ B α nicht in für eine Isolierung ausreichenden Mengen produziert werden. VP22 oder VP22-I κ B α wurden gar nicht in Bakterien synthetisiert. Abhilfe schaffte die Reduzierung der VP22-Sequenz auf die C-terminale Hälfte (VP22 Δ ₁₋₁₅₉) oder sogar auf die C-terminalen 34 Aminosäuren (VP22 Δ ₁₋₂₆₇). I κ B α und Δ _NI κ B α , die N-terminal mit diesen VP22-Varianten fusioniert worden waren, wurden sehr gut in Bakterien exprimiert und konnten mit gutem Erfolg aufgereinigt werden. Sämtliche Fusionskonstrukte wurden effektiv und spezifisch nach exogener Verabreichung von Zellen internalisiert. Damit wurde erstmals zum einen der Import von VP22 Δ ₁₋₁₅₉-Fusionsproteinen gezeigt und zum anderen nachgewiesen, dass die 34 C-terminalen Aminosäuren von VP22 für die Transduktion durch biologische Membranen ausreichend sind. Bis auf VP22 Δ ₁₋₁₅₉-I κ B α waren die Konstrukte jedoch schwache NF- κ B-Inhibitoren *in vitro*. Keines der Fusionsproteine war im Stande, nach Aufnahme in die Zelle den Transkriptionsfaktor *in vivo* zu inhibieren. Die Gründe für das funktionelle Versagen der Proteine sind in ihrer physiko-chemischen Natur zu suchen, die ebenfalls für das Akkumulieren von VP22 Δ ₁₋₁₅₉-I κ B α in intrazellulären Aggregaten verantwortlich gemacht werden kann.

Auch das aus den 293 Zelllysaten importierte VP22-I κ B α zeigte eine Tendenz zur intrazellulären Aggregatbildung, die allerdings im Vergleich zu VP22 Δ ₁₋₁₅₉-I κ B α weniger stark ausgeprägt war. Somit war die Menge an löslichem, zugänglichem Protein in der Zelle groß genug, um einen potenten Hemmeffekt von NF- κ B zu erzielen.

Das einzige System, das die Aufreinigung von VP22-I κ B α ermöglichte, war die baculovirale Expression in Sf-9 Insektenzellen. Hochreines VP22-I κ B α wurde analog den bakteriell exprimierten Fusionsproteinen effektiv und spezifisch in Zellen aufgenommen, war aber im Gegensatz zu diesen gleichzeitig ein potenter Inhibitor der NF- κ B-Aktivität sowohl *in vitro* als auch *in vivo*.

Als weitere Alternative, um I κ B α mittels Proteintransduktionstechnologie in Zellen einzuschleusen, wurde das vor kurzem beschriebene Importpeptid Pep-1 getestet. Es vermochte zwar einen effizienten intrazellulären Import von I κ B α zu vermitteln, allerdings konnte keine signifikante Reduzierung der NF- κ B-Aktivität detektiert werden.

Der Einsatz von I κ B α zur Inhibition von NF- κ B gewährleistet gegenüber anderen bereits in der Therapie angewandten Ansätzen, die an anderen Punkten des NF- κ B-Aktivierungsweges eingreifen, ein Höchstmaß an Spezifität. Die Erfolge, die mit aufgereinigtem, rekombinantem

VP22-I κ B α erzielt wurden, unterstreichen das Potential der Proteintransduktionstechnologie als Strategie, die Aktivität des Transkriptionsfaktors zu regulieren. Der limitierende Faktor für die Anwendung von VP22-I κ B α war die geringe Ausbeute an hochreinem Protein, das große Probleme bei der Expression und Isolierung machte. Aufbauend auf den in der vorliegenden Arbeit präsentierten Ergebnissen sollte es jedoch möglich sein, die eingeschlagene Strategie weiterzuentwickeln und ihre therapeutische Wirksamkeit auch in Tiermodellen unter Beweis zu stellen.

6 Literatur

- Aggarwal, B. B. (2000). Apoptosis and nuclear factor- κ B: a tale of association and dissociation. *Biochem. Pharmacol.* *60*, 1033-1039.
- Aints, A., Dilber, M. S., Smith, C. L. (1999). Intercellular spread of GFP-VP22. *J. Gene Med.* *1*, 275-279.
- Aints, A., Guven, H., Gahrton, G., Smith, C. I., Dilber, M. S. (2001). Mapping of herpes simplex virus-1 VP22 functional domains for inter- and subcellular targeting. *Gene Ther.* *8*, 1051-1060.
- Anderson, D. C., Nichols, E., Manger, R., Woodle, D., Barry, M., Fritzberg, A. R. (1993). Tumor cell retention of antibody Fab fragments is enhanced by an attached HIV TAT protein-derived peptide. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* *194*, 876-884.
- Aradhya, S., Nelson, D. L. (2001). NF- κ B signaling and human disease. *Curr. Opin. Gen. Dev.* *11*, 300-306.
- Arenzana-Seisdedos, F. J., Thompson, J., Rodriguez, M. S., Bachelier, F., Thomas, D., Hay, R. T. (1995). Inducible nuclear expression of newly synthesized I κ B α negatively regulates DNA-binding and transcriptional activities of NF- κ B. *Mol. Cell. Biol.* *15*, 2689-2696.
- Baldwin, A. S. (1996). The NF- κ B and I κ B proteins: new discoveries and insights. *Annu. Rev. Immunol.* *14*, 649-681.
- Beg, A. A., Sha, W. C., Bronson, R. T., Ghosh, S., Baltimore, D. (1995). Embryonic lethality and liver degeneration in mice lacking the RelA component of NF- κ B. *Nature* *376*, 167-170.
- Beg, A. A., Baltimore, D. (1996). An essential role for NF- κ B in preventing TNF- α -induced cell death. *Science* *274*, 782-784.
- Bender, K., Gottlicher, M., Whiteside, S., Rahmsdorf, H. J., Herrlich, P. (1998). Sequential DNA damage-independent and -dependent activation of NF- κ B by UV. *EMBO J.* *17*, 5170-5181.
- Bennet, R. P., Dalby, B. (2002). Protein delivery using VP22. *Nat. Biotechnol.* *20*, 20.
- Beraud, C., Henzel, W. J., Baeuerle, P. A. (1999). Involvement of regulatory and catalytic subunits of phosphoinositide 3-kinase in NF- κ B activation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* *96*, 429-434.
- Bours, V., Franzoso, G., Azarenko, V., Park, S., Kanno, T., Brown, K., Siebenlist, U. (1993). The oncoprotein Bcl-3 directly transactivates through κ B motifs via association with DNA-binding p50 homodimers. *Cell* *72*, 729-739.
- Bradford, M. (1976). A rapid method for the quantification of microgram quantities of proteins utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* *72*, 248-254.

- Brewis, N., Phelan, A., Webb, J., Drew, J., Elliott, G., O'Hare, P. (2000). Evaluation of VP22 spread in tissue culture. *J. Virol.* *74*, 1051-1056.
- Brown, K., Gerstberger, S., Carlson, L., Franzoso, G., Siebenlist, U. (1995). Control of I κ B α proteolysis by site-specific, signal-induced phosphorylation. *Science* *267*, 1485-1491.
- Burkly, L., Hession, C., Ogata, L., Reilly, C., Marconi, L. A., Olson, D., Tizard, R., Cate, R., Lo, D. (1995). Expression of relB is required for the development of thymic medulla and dendritic cells. *Nature* *373*, 531-536.
- Calnan, B. J., Biancalana, S., Hudson, D., Frankel, A. D. (1991). Analysis of arginine-rich peptides from the HIV Tat protein reveals unusual features of RNA-protein recognition. *Genes Dev.* *5*, 201-210.
- Caron, N. J., Torrente, Y., Camirand, G., Bujold, M., Chapdelaine, P., Leriche, K., Bresolin, N., Tremblay, J. P. (2001). Intracellular delivery of a Tat-eGFP fusion protein into muscle cells. *Mol. Ther.* *3*, 310-318.
- Chatelin, L., Volovitch, M., Joliot, A. H., Perez, F., Prochiantz, A. (1996). Transcription factor Hoxa-5 is taken up by cells in culture and conveyed to their nuclei. *Mech. Dev.* *55*, 111-117.
- Chen, F., Castranova, V., Shi, X., Demers, L. M. (1999). New insights into the role of nuclear factor- κ B, a ubiquitous transcription factor in the initiation of diseases. *Clin. Chem.* *45*, 7-17.
- Chen, F., Castranova, V., Shi, X. (2001). New insights into the role of nuclear factor- κ B in cell growth regulation. *Am. J. Pathol.* *159*, 387-397.
- Chen, F. E., Huang, D. B., Chen, Y. Q., Ghosh, G. (1998). Crystal structure of p50/p65 heterodimer of transcription factor NF- κ B bound to DNA. *Nature* *391*, 410-413.
- Chen, F. E., Ghosh, G. (1999). Regulation of DNA binding by Rel/NF- κ B transcription factors: structural views. *Oncogene* *18*, 6845-6852.
- Chen, Y. Q., Ghosh, S., Ghosh, G. (1998). A novel DNA recognition mode by the NF- κ B p65 homodimer. *Nat. Struct. Biol.* *5*, 67-73.
- Cheng, W. F., Hung, C. H., Chai, C. Y., Hsu, K. F., He, L., Ling, M., Wu, T. C. (2001). Enhancement of sindbis virus self-replicating RNA vaccine potency by linkage of herpes simplex virus type 1 VP22 antigen. *J. Virol.* *75*, 2368-2376.
- Davis, N., Ghosh, S., Simmons, D. L., Tempst, P., Liou, H. C., Baltimore, D., Bose, H. R. (1991). Rel-associated pp40: an inhibitor of the rel family of transcription factors. *Science* *253*, 1268-1271.
- Delhase, M., Hayakawa, M., Chen, Y., Karin, M. (1999). Positive and negative regulation of I κ B kinase activity through IKK β subunit phosphorylation. *Science* *284*, 309-313.
- Derer, W., Easwaran, H. P., Leonhardt, H., Cardoso, M. C. (2002). A novel approach to induce cell cycle reentry in terminally differentiated muscle cells. *FASEB J.* *16*, 132-133.

- Derossi, D., Joliot, A. H., Chassaing, G., Prochiantz, A. (1994). The third helix of Antennapedia homeodomain translocates through biological membranes. *J. Biol. Chem.* 269, 10444-10450.
- Derossi, D., Calvet, S., Trembleau, A., Brunissen, A., Chassaing, G., Prochiantz, A. (1996). Cell internalization of the third helix of the Antennapedia homeodomain is receptor-independent. *J. Biol. Chem.* 271, 18188-18193.
- Derossi D., Chassaing, G., Prochiantz, A. (1998). Trojan peptides: the penetratin system for intracellular delivery. *Trends Cell. Biol.* 8, 84-87.
- DiDonato, J. A., Hayakawa, M., Rothwarf, D. M., Zandi, E., Karin, M. (1997). A cytokine-responsive I κ B kinase that activates the transcription factor NF- κ B. *Nature* 388, 548-554.
- Dilber, M. S., Phelan, A., Aints, A., Mohamed, A. J., Elliott, G., Smith, C. L., O'Hare, P. (1999). Intercellular delivery of thymidin kinase prodrug activating enzyme by the herpes simplex virus protein, VP22. *Gene Ther.* 6, 12-21.
- Doi, T. S., Takahashi, T., Taguchi, O., Azuma, T., Obata, Y. (1997). NF- κ B RelA-deficient lymphocytes: normal development of T cells and B cells, impaired production of IgA and IgG1 and reduced proliferative responses. *J. Exp. Med.* 185, 953-961.
- Egleton, R. D., Davis, T. P. (1997). Bioavailability and transport of peptides and peptide drugs into the brain. *Peptides* 18, 1431-1439.
- Elliger, S. S., Elliger, C. A., Lang, C., Watson, G. L. (2002). Enhanced secretion and uptake of β -glucuronidase improves adeno-associated viral-mediated gene therapy of mucopolysaccharidosis type VII mice. *Mol. Ther.* 5, 617-626.
- Elliott, G., Meredith, D. M. (1992). The herpes simplex virus type 1 tegument protein VP22 is encoded by gene UL49. *J. Gen. Virol.* 73, 723-726.
- Elliott, G., O'Reilly, D., O'Hare, P. (1996). Phosphorylation of the herpes simplex virus type 1 tegument protein VP22. *Virology* 226, 140-145.
- Elliott, G., O'Hare, P. (1997). Intercellular trafficking and protein delivery by a herpesvirus structural protein. *Cell* 88, 223-233.
- Elliott, G., O'Hare, P. (1998). Herpes simplex virus type 1 tegument protein VP22 induces the stabilization and hyperacetylation of microtubules. *J. Virol.* 72, 6448-6455.
- Elliott, G., O'Reilly, D., O'Hare, P. (1999). Identification of phosphorylation sites within the herpes simplex virus tegument protein VP22. *J. Virol.* 73, 6203-6206.
- Elliott, G., O'Hare, P. (1999). Intercellular trafficking of VP22-GFP fusion proteins. *Gene Ther.* 6, 149-151.
- Elliott, G., O'Hare, P. (2000). Cytoplasm-to-nucleus translocation of a herpesvirus tegument protein during cell division. *J. Virol.* 74, 2131-2141.

- Ensoli, B., Buonaguro, L., Barillari, G, Fiorelli, V., Gendelman, R., Morgan, R. A., Wingfield, P., Gallo, R. C. (1993). Release, uptake, and effects of extracellular human immunodeficiency virus type 1 Tat protein on cell growth and viral transactivation. *J. Virol.* *67*, 277-287.
- Epinat, J. C., Gilmore, T. D. (1999). Diverse agents act at multiple levels to inhibit the Rel/NF- κ B signal transduction pathway. *Oncogene* *18*, 6896-6909.
- Fang, B., Xu, B., Koch, P., Roth, J. A. (1998). Intercellular trafficking of VP22-GFP fusion proteins is not observed in cultured mammalian cells. *Gene Ther.* *5*, 1420-1424.
- Fawell, S., Seery, J., Daikh, Y., Moore, C., Chen, L. L., Pepinsky, B., Barsourn, J. (1994). Tat-mediated delivery of heterologous proteins into cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* *91*, 664-668.
- Ford, K. G., Souberbielle, B. E., Darling, D., Farzaneh, F. (2001). Protein transduction: an alternative to genetic intervention? *Gene Ther.* *8*, 1-4.
- Frankel, A., Pabo, C. O. (1988). Cellular uptake of the Tat protein from human immunodeficiency virus. *Cell* *55*, 1189-1193.
- Franzoso, G., Bours, V., Azarenko, V., Park, S., Tomita-Yamaguchi, M., Kanno, T., Brown, K., Siebenlist, U. (1993). The oncoprotein Bcl-3 can facilitate NF- κ B-mediated transactivation by removing inhibiting p50 homodimers from select κ B sites. *EMBO J.* *12*, 3893-3901.
- Franzoso, G., Carlson, L., Poljak, L., Shores, E. W., Epstein, S., Leonardi, A., Grinberg, A., Tran, T., Boyce, B. F., Siebenlist, U. (1998). Mice deficient in nuclear factor (NF)- κ B/p52 present with defects in humoral responses, germinal center reactions, and splenic microarchitecture. *J. Exp. Med.* *187*, 147-159.
- Gehring, W. J. (1987). Homeo boxes in the study of development. *Science* *236*, 1245-1252.
- Gerondakis, S., Grossmann, M., Nakamura, Y., Pohl, T., Grumont, R. (1999). Genetic approaches in mice to understand Rel/NF- κ B and I κ B function: transgenics and knockouts. *Oncogene* *18*, 6888-6895.
- Ghosh, G., Vanduyne, G., Ghosh, S., Sigler, P. B. (1995). Structure of NF- κ B p50 homodimer bound to a κ B site. *Nature* *373*, 303-310.
- Ghosh, S., Baltimore, D. (1990). Activation in vitro of NF- κ B by phosphorylation of its inhibitor I κ B. *Nature* *344*, 678-682.
- Ghosh, S., May, M. J., Kopp, E. B. (1998). NF- κ B and Rel proteins: evolutionarily conserved mediators of immune responses. *Annu. Rev. Immunol.* *16*, 225-260.
- Green, M., Loewenstein, P. M. (1988). Autonomous functional domains of chemically synthesized human immunodeficiency virus tat *trans*-activator protein. *Cell* *55*, 1179-1188.

- Grumont, R. J., Rourke, J. J., O'Reilly, L. A., Strasser, A., Miyake, K., Sha, W., Gerondakis, S. (1998). B lymphocytes differentially use the Rel and nuclear factor kappa B1 (NF- κ B1) transcription factor to regulate cell cycle progression and apoptosis in quiescent and mitogen-activated cells. *J. Exp. Med.* *187*, 663-674.
- Harada, H., Hiraoka, M., Kizaka-Kondoh, S. (2002). Antitumor effect of TAT-oxygen-dependent degradation-caspase-3 fusion protein specifically stabilized and activated in hypoxic tumor cells. *Cancer Res.* *62*, 2013-2018.
- Haskill, S., Beg, A. A., Tompkins, S. M., Morris, J. S., Yurochko, A. D., Sampson-Johannes, A., Mondal, K., Ralph, P., Baldwin, A. S. (1991). Characterization of an immediate-early gene induced in adherent monocytes that encodes I κ B-like activity. *Cell* *65*, 1281-1289.
- He, H., Furmanski, P. (1995). Sequence specificity and transcriptional activation in the binding of lactoferrin to DNA. *Nature* *373*, 721-724.
- Heissmeyer, V., Krappmann, D., Hatada, E. N., Scheidereidt, C. (2001). Shared pathways of I κ B kinase-induced SCF(β TrCP) mediated ubiquitination and degradation of the NF- κ B precursor p105 and I κ B α . *Mol. Cell. Biol.* *21*, 1024-1035.
- Hu, Y., Baud, V., Delhase, M., Zhang, P., Deerinck, T., Ellisman, M., Johnson, R., Karin, M. (1999). Abnormal morphogenesis but intact IKK activation in mice lacking the IKK α subunit of I κ B kinase. *Science* *284*, 316-320.
- Hu, Y., Baud, V., Oga, T., Kim, K. I., Yoshida, K., Karin, M. (2001). IKK α controls formation of the epidermis independently of NF- κ B. *Nature* *410*, 710-714.
- Hung, C. F., Cheng, W. F., Chai, C. Y., Hsu, K. F., He, L., Ling, M., Wu, T. C. (2001). Improving vaccine potency through intercellular spreading and enhanced MHC class I presentation of antigen. *J. Immunol.* *166*, 5733-5740.
- Huxford, T., Huang, D. B., Malek, S., Ghosh, G. (1998). The crystal structure of the I κ B α /NF- κ B complex reveals mechanisms of NF- κ B inactivation. *Cell* *95*, 759-770.
- Inoue, J., Kerr, L. D., Kakizuka, A., Verma, I. M. (1992). I κ B γ , a 70 kDa protein identical to the C-terminal half of p110 NF- κ B: a new member of the I κ B family. *Cell* *68*, 1109-1120.
- Imbert, V., Rupec, R. A., Livolsi, A., Pahl, H. L., Traencker, E. B., Müller-Dieckmann, C., Farahifar, D., Rossi, B., Auberger, P., Baeuerle, P. A., Peyron, J. F. (1996). Tyrosine phosphorylation of I κ B α activates NF- κ B without proteolytic degradation of I κ B α . *Cell* *86*, 787-798.
- Jacobs, M. D., Harrison, S. C. (1998). Structure of an I κ B α /NF- κ B complex. *Cell* *95*, 749-758.
- Jin, L. H., Bahn, J. H., Eum, W. S., Kwon, H. Y., Jang, S. H., Han, K. H., Kang, T. C., Won, M. H., Kang, J. H., Cho, S. W., Park, J., Choi, S. Y. (2001). Transduction of human catalase mediated by an HIV-1 TAT protein basic domain and arginine-rich peptides into mammalian cells. *Free Radic. Biol. Med.* *31*, 1509-1519.

- Johnson, C., Van Antwerp, D., Hope, T. J. (1999). An N-terminal nuclear export signal is required for the nucleocytoplasmic shuttling of I κ B α . *EMBO J.* 18, 6682-6693.
- Joliot, A., Pernelle, C., Deagostini-Bazin, H., Prochiantz, A. (1991). Antennapedia homeobox peptide regulates neural morphogenesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88, 1864-1868.
- Joliot, A., Maizel, A., Rosenberg, D., Trembleau, A., Dupas, S., Volovitch, M., Prochiantz, A. (1998). Identification of a signal sequence necessary for the unconventional secretion of Engrailed homeoprotein. *Curr. Biol.* 8, 856-863.
- Karin, M. (1999). How NF- κ B is activated: the role of the I κ B kinase (IKK) complex. *Oncogene* 18, 6867-6874.
- Karin, M., Ben-Neriah, Y. (2000). Phosphorylation meets ubiquitination: the control of NF- κ B activity. *Ann. Rev. Immunol.* 18, 621-663.
- Karin, M., Cao, Y., Greten, F. R., Li, Z.-W. (2002). NF- κ B in cancer: from innocent bystander to major culprit. *Nature Rev. Cancer* 2, 301-310.
- Keresztes, M. und Boonstra, J. (1999). Import(ance) of growth factors in the nucleus. *J. Cell. Biol.* 145, 421-424.
- Köntgen, F., Grumont, R. J., Strasser, A., Metcalf, D., Li, R., Tarlington, D., Gerondakis, S. (1995). Mice lacking the c-Rel protooncogene exhibit defects in lymphocyte proliferation, humoral immunity, and interleukin-2 expression. *Genes Dev.* 9, 1965-1977.
- Kueltzo, L. A., Normand, N., O'Hare, P., Middaugh, C. R. (2000). Conformational lability of herpesvirus protein VP22. *J. Biol. Chem.* 275, 33213-33221.
- Leslie, J., Rixon, F. J., McLauchlan, J. (1996). Overexpression of the herpes simplex virus type 1 tegument protein VP22 increases its incorporation into virus particles. *Virology* 220, 60-68.
- Li, C. C., Dai, R. M., Chen, E., Longo, D. L. (1994). Phosphorylation of NF- κ B1-p50 is involved in NF- κ B activation and stable DNA binding. *J. Biol. Chem.* 269, 30089-30092.
- Li, N., Karin, M. (1998). Ionizing radiation and short wavelength UV activate NF- κ B through two distinct mechanisms. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95, 13012-13017.
- Li, Q., Van Antwerp, D., Mercurio, F., Lee, K. F., Verma, I. M. (1999). Severe liver degeneration in mice lacking the I κ B kinase 2 gene. *Science* 284, 321-325.
- Li, X. H., Fang, X., Gaynor, R. B. (2001). Role of IKK γ /nemo in assembly of the I κ B kinase complex. *J. Biol. Chem.* 276, 4494-4500.
- Li, Z., Nabel, G. J. (1997). A new member of the I κ B protein family, I κ B ϵ , inhibits relA (p65)-mediated NF- κ B transcription. *Mol. Cell. Biol.* 17, 6184-6190.

- Li, Z. W., Chu, W., Hu, Y., Delhase, M., Deerinck, T., Ellisman, M., Johnson, R., Karin, M. (1999). The IKK β subunit of I κ B kinase (IKK) is essential for NF- κ B activation and prevention of apoptosis. *J. Exp. Med.* 189, 1839-1845.
- Liu, C.-S., Kong, B.-H., Xia, H. H., Ellem, K. A. O., Wie, M. Q. (2001). VP22 enhanced intercellular trafficking of HSV thymidine kinase reduced the level of ganciclovir needed to cause suicide cell death. *J. Gene Med.* 3, 145-152.
- Loret, E. P., Vives, E., Ho, P. S., Rochat, H., Van Rietschoten, J., Johnson, W. C. Jr. (1991). Activating region of HIV-1 Tat protein: vacuum circular dichroism and energy minimization. *Biochemistry* 30, 6013-6023.
- Lundberg, M., Johansson, M. (2001). Is VP22 nuclear homing an artifact? *Nat. Biotechnol.* 19, 713-714.
- Lundberg, M., Johansson, M. (2002). Positively charged DNA-binding proteins cause apparent cell membrane translocation. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 291, 367-371.
- Makarov, S. S. (2000). NF- κ B as a therapeutic target in chronic inflammation: recent advances. *Mol. Med. Today* 9, 441-448.
- Malek, S., Chen, Y., Huxford, T., Ghosh, G. (2001). I κ B β , but not I κ B α , functions as a classical cytoplasmic inhibitor of NF- κ B dimers by masking both NF- κ B nuclear localization sequences in resting cells. *J. Biol. Chem.* 276, 45225-45235.
- Martin, A., O'Hare, P., McLauchlan, J., Elliott, G. (2002). Herpes simplex virus tegument protein VP22 contains overlapping domains for cytoplasmic localization, microtubule interaction, and chromatin binding. *J. Virol.* 76, 4961-4970.
- Mattson, M. P., Culmsee, C., Yu, Z., Camandola, S. (2000). Roles of nuclear factor kappa B in neuronal survival and plasticity. *J. Neurochem.* 74, 443-456.
- May, M. J., Ghosh, S. (1998). Signal transduction through NF- κ B. *Immunol. Today* 19, 80-88.
- May, M. J., D'Aquisto, F., Madge, L. A., Glöckner, J., Pober, J. S., Ghosh, S. (2000). Selective inhibition of NF- κ B activation by a peptide that blocks the interaction of NEMO with the I κ B kinase complex. *Science* 289, 1550-1554.
- McKinsey, T. A., Chu, Z.-L., Ballard, D. W. (1997). Phosphorylation of the PEST domain of I κ B β regulates the function of NF- κ B/I κ B β complexes. *J. Biol. Chem.* 272, 22377-22380.
- Mercurio, F., Zhu, H., Murray, B. W., Shevchenko, A., Bennett, B. L., Li, J., Young, D. B., Barbosa, M., Mann, M., Manning, A., Rao, A. (1997). IKK-1 and IKK-2: cytokine-activated I κ B kinases essential for NF- κ B activation. *Science* 278, 860-866.
- Mercurio, F., Manning, A. M. (1999). NF- κ B as a primary regulator of the stress response. *Oncogene* 18, 6163-6171.

- Morris, M. C., Depollier, J., Mery, J., Heitz, F., Divita, G. (2001). A peptide carrier for the delivery of biologically active proteins into mammalian cells. *Nat. Biotechnol.* *19*, 1173-1176.
- Morrison, E. E., Wang, Y. F., Meredith, D. M. (1998). Phosphorylation of structural components promotes dissociation of the herpes simplex virus type 1 tegument. *J. Virol.* *72*, 7108-7114.
- Müller, C. W., Rey, F. A., Sodeoka, M., Verdine, G. L., Harrison, S. C. (1995). Structure of the NF- κ B homodimer bound to DNA. *Nature* *373*, 311-317.
- Nagahara, H., Vocero-Akbani, A. M., Snyder, E. L., Ho, A., Latham, D. G., Lissy, N. A., Becker-Hapak, M., Ezhevsky, S. A., Dowdy, S. F. (1998). Transduction of full-length TAT fusion proteins into mammalian cells: TAT-p27^{Kip1} induces cell migration. *Nat. Med.* *4*, 1449-1452.
- Neurath, M. F., Pettersson, S., Meyer zum Buschfelde, K. H., Strober, W. (1996). Local administration of antisense phosphorothioate oligonucleotides to the p65 subunit of NF- κ B abrogates established experimental colitis in mice. *Nature Med.* *2*, 998-1004.
- Normand, N., van Leeuwen, H., O'Hare, P. (2001). Particle formation by a conserved domain of the herpes simplex virus protein VP22 facilitating protein and nucleic acid delivery. *J. Biol. Chem.* *276*, 15042-15050.
- Ohno, H., Takimoto, G., McKeithan, T. W. (1990). The candidate protooncogene bcl-3 is related to genes implicated in cell lineage determination and cell cycle control. *Cell* *60*, 991-997.
- Oliveira, S. C., Harms, J. S., Afonso, R. R., Splitter, G. A. (2001). A genetic immunization adjuvant system based on BVP22-antigen fusion. *Hum. Gene Ther.* *12*, 1353-1359.
- O'Reilly, D. R., Miller, L. K., Luckow, V. A. (1992). *Baculoviral expression vectors: a laboratory manual*. New York, N. Y.: W. H. Freeman and Company.
- Orian, A., Gonen, H., Bercovich, B., Fajerman, I., Eytan, E., Israel, A., Mercurio, F., Iwai, K., Schwartz, A. L., Ciechanover, A. (2001). SCF(β -TrCP) ubiquitin ligase mediated processing of NF- κ B p105 requires phosphorylation of its C-terminus by I κ B kinase. *EMBO J.* *19*, 2580-2591.
- Ossareh-Nazari, B., Bachelier, F., Dargemont, C. (1997). Evidence for a role of CRM1 in signal-mediated nuclear protein export. *Science* *278*, 141-144.
- Pahl, H. L. (1999). Activators and target genes of Rel/NF- κ B transcription factors. *Oncogene* *18*, 6853-6866.
- Palombella, V. J., Rando, O. J., Goldberg, A. L., Maniatis, T. (1994). The ubiquitin-proteasome pathway is required for processing the NF- κ B1 precursor protein and the activation of NF- κ B. *Cell* *78*, 773-785.

- Peitz, M., Pfannkuche, K., Rajewsky, K., Edenhofer, F. (2002). Ability of the hydrophobic FGF and basic TAT peptides to promote cellular uptake of recombinant Cre recombinase: a tool for efficient genetic engineering of mammalian genomes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* *99*, 4489-4494.
- Peters, R. T., Liao, S. M., Maniatis, T. (2000). IKK ϵ is part of a novel PMA-inducible I κ B kinase complex. *Mol. Cell* *5*, 513-522.
- Phelan, A., Elliott, G., O'Hare, P. (1998). Intercellular delivery of functional p53 by the herpesvirus protein VP22. *Nat. Biotechnol.* *16*, 440-443.
- Plank, C., Oberhauser, B., Mechtler, K., Koch, C., Wagner, E. (1994). The influence of endosome-disruptive peptides on gene transfer using synthetic virus-like gene transfer systems. *J. Biol. Chem.* *269*, 12918-12924.
- Poyet, J. L., Srinivasula, S. M., Lin, J. H., Fernandes-Alnemri, T., Yamaoka S., Tsichlis, P. N., Alnemri, E. S. (2000). Activation of the I κ B kinase by RIP via IKK γ /NEMO-mediated oligomerization. *J. Biol. Chem.* *275*, 37966-37977.
- Prochiantz, A. (2000). Messenger proteins: homeoproteins, Tat and others. *Curr. Opin. Cell Biol.* *12*, 400-406.
- Rayet, B., Gelinas, C. (1999). Aberrant *rel/nfkb* genes and activity in human cancer. *Oncogene* *18*, 6938-6947.
- Regnier, C. H., Song, H. Y., Gao, X., Goeddel, D. V., Cao, Z., Rothe, M. (1997). Identification and characterization of an I κ B kinase. *Cell* *90*, 373-383.
- Rothwarf, D. M., Zandi, E., Natoli, G., Karin, M. (1998). IKK γ is an essential regulatory subunit of the I κ B kinase complex. *Nature* *395*, 297-300.
- Rudolph, D., Yeh, W. C., Wakeham, A., Rudolph, B., Nallainathan, D., Potter, J., Elia, A. J., Mak, T. W. (2000). Severe liver degeneration and lack of NF- κ B activation in NEMO/IKK γ -deficient mice. *Genes Dev.* *14*, 854-862.
- Sachdev, S., Hoffmann, A., Hannink, M. (1998). Nuclear localization of I κ B α is mediated by the second ankyrin repeat: the I κ B α ankyrin repeats define a novel class of *cis*-acting nuclear import sequences. *Mol. Cell. Biol.* *18*, 2524-2534.
- Salmeron, A., Janzen, J., Soneji, Y., Bump, N., Kamens, J., Allen, H., Ley, S. C. (2001). Direct phosphorylation of NF- κ B1 p105 by the I κ B kinase complex on serine 927 is essential for signal-induced p105 proteolysis. *J. Biol. Chem.* *276*, 22215-22222.
- Scherer, D. C., Brockmann, J., Chen, Z., Maniatis, T., Ballard, D. (1995). Signal-induced degradation of I κ B α requires site-specific ubiquitination. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* *92*, 11259-11263.
- Schmitz, M. L., Baeuerle, P. A. (1991). The p65 subunit is responsible for the strong transcriptional activation potential of NF- κ B. *EMBO J.* *10*, 3805-3817.

- Schwarze, S. R., Ho, A., Vocero-Akbani, A., Dowdy, S. F. (1999). In vivo protein transduction: delivery of a biologically active protein into the mouse. *Science* 285, 1569-1572.
- Schwarze, S. R., Dowdy, S. F. (2000). In vivo protein transduction: intracellular delivery of biologically active proteins, compounds and DNA. *Trends Pharmacol. Sci.* 21, 45-48.
- Sen, R. und Baltimore, D. (1986). Inducibility of the immunoglobulin enhancer binding protein NF- κ B by a posttranslational mechanism. *Cell* 47, 921-928.
- Senftleben, U., Cao Y., Xiao, G., Greten, F. R., Krahn, G., Bonizzi, G., Chen, Y., Hu, Y., Fong, A., Sun, S. C., Karin, M. (2001). Activation by IKK α of a second, evolutionary conserved, NF- κ B signaling pathway. *Science* 293, 1495-1499.
- Sha, W. C., Liou, H. C., Tuomanen, E., Baltimore, D. (1995). Targeted disruption of the p50 subunit of NF- κ B leads to multifocal defects in immune responses. *Cell* 80, 573-582.
- Shimada, T., Kawai, T., Takeda, K., Matsumoto, M., Inoue, J., Tatsumi, Y., Kanamura, A., Akira, S. (1999). IKK-i, a novel lipopolysaccharide-inducible kinase that is related to I κ B kinases. *Int. Immunol.* 11, 1357-1362.
- Simeonidis, S., Liang, S., Chen, G. Y., Thanos, D. (1997). Cloning and functional characterization of mouse I κ B ϵ . *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94, 14372-14377.
- Solan, N. J., Miyoshi, H., Carmona, E. M., Bren, G. D., Paya, C. V. (2002). RelB cellular regulation and transcriptional activity are regulated by p100. *J. Biol. Chem.* 277, 1405-1418.
- Stephens, R. M., Rice, N. R., Hiebsch, R.R., Bose, H. R. (1983). Nucleotide sequence of v-Rel: the oncogene of the reticuloendotheliosis virus. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 80, 6229-6232.
- Sun, S. C., Ganchi, P. A., Ballard, D. W., Green, W. C. (1993). NF- κ B controls expression of inhibitor I κ B α . Evidence for an inducible autoregulatory pathway. *Science* 259, 1912-1915.
- Suyang, H., Phillips, R., Douglas, I., Ghosh, S. (1996). Role of unphosphorylated, newly synthesized I κ B β in persistent activation of NF- κ B. *Mol. Cell. Biol.* 16, 5444-5449.
- Tak, P. P., Firestein, G. S. (2001). NF- κ B: a key role in inflammatory diseases. *J. Clin. Invest.* 107, 7-11.
- Takeda, K., Takeuchi, O., Tsujimura, T., Hami, S., Adachi, O., Kawai, T., Sanjo, H., Yochikawa, K., Terada, N., Akira, S. (1999). Limb and skin abnormalities in mice lacking IKK α . *Science* 284, 313-316.
- Tam, W. F., Sen, R. (2000). I κ B family members function by different mechanisms. *J. Biol. Chem.* 276, 7701-7704.

- Tanaka, M., Fuentes, M. E., Yamaguchi, K., Durnin, M. H., Dalrymple, S. A., Hardy, K. L., Goeddel, D. V. (1999). Embryonic lethality, liver degeneration, and impaired NF- κ B activation in IKK β -deficient mice. *Immunity* *10*, 421-429.
- Tarantini, F., La Vallee, T., Jackson, A., Gamble, S., Mouta Carreira, C., Garfinkel, S., Burgess, W. H., Maciag, T. (1998). The extravesicular domain of synaptotagmin-1 is released with the latent fibroblast growth factor-1 homodimer in response to heat shock. *J. Biol. Chem.* *273*, 22209-22216.
- Theodore, L., Derossi, D., Chassaing, G., Llirbat, B., Kubes, M., Jordan, P., Chneiweiss, H., Godement, P., Prochiantz, A. (1995). Intraneuronal delivery of protein kinase C pseudosubstrate leads to growth cone collapse. *Neurosciences* *15*, 7185-7187.
- Thompson, J. E., Phillips, R. J., Erdjument-Bromage, H., Tempst, P., Ghosh, S. (1995). I κ B β regulates the persistent response in a biphasic activation of NF- κ B. *Cell* *80*, 573-582.
- Tojima, Y., Fujimoto, A., Delhase, M., Chen, Y., Hatakeyama, S., Nakayama, K., Kaneko, Y., Nimura, Y., Motoyama, N., Ikeda, K., Karin, M., Nakanishi, M. (2000). NAK is an I κ B kinase-activating kinase. *Nature* *404*, 778-782.
- Tomita, T., Takeuchi, E., Tomita, N., Morishita, R., Kaneko, M., Yamamoto, K., Nakase, T., Seki, H., Kato, K., Kaneda, Y., Ochi, T. (1999). Suppressed severity of collagen-induced arthritis by *in vivo* transfection of nuclear factor kappa B decoy oligodeoxynucleotides as a gene therapy. *Arthritis Rheum.* *42*, 2532-2542.
- Tran, K., Merika, M., Thanos, D. (1997). Distinct functional properties of I κ B α and I κ B β . *Mol. Cell. Biol.* *17*, 5386-5399.
- Van de Waterbeemd, H., Camnisch, G., Folkers, G., Chretien, J. R., Raevsky, O. A. (1998). Estimation of blood-brain barrier crossing of drugs using molecular size and shape, and H-bonding descriptors. *J. Drug Target* *6*, 151-165.
- Vaughn, J. L., Goodwin, R. H., Tompkins, G. J., McCawley, P. (1977). The establishment of two cell lines from the insect *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae). *In Vitro* *13*, 213-217.
- Verma, I., Stevenson, J. K., Schwarz, E. M., Van Antwerp, D., Myamoto, S. (1995). Rel/ NF- κ B/ I κ B family: intimate tales of association and dissociation. *Genes Dev.* *9*, 2723-2735.
- Vives, E., Brodin, P., Lebleu, B. (1997). A truncated HIV-1 Tat protein basic domain translocates through the plasma membrane and accumulates in the cell nucleus. *J. Biol. Chem.* *272*, 16010-16017.
- Wang, C., Deng, L., Hong, M., Akkaraju, G. R., Inoue, J., Chen, Z. J. (2001). TAK1 is a ubiquitin-dependent kinase of MKK and IKK. *Nature* *412*, 346-351.
- Wang, C.-Y., Cusack, J. C., Liu, R., Baldwin, A. S. (1999). Control of inducible chemoresistance: enhanced anti-tumor therapy through increased apoptosis by inhibition of NF- κ B. *Nature Med.* *5*, 412-417.

- Weih, F., Carrasco, D., Durham, S. K., Barton, D. S. Rizzo, C. A., Ryseck, R. P., Lira, S. A., Bravo, R. (1995). Multiorgan inflammation and hematopoietic abnormalities in mice with targeted disruption of RelB, a member of the NF- κ B/Rel family. *Cell* 80, 331-340.
- Whiteside, S. T., Epinat, J.-C., Rice, N. R., Israel, A. (1997). I κ B ϵ , a novel member of the I κ B family, controls RelA and c-Rel NF- κ B activity. *EMBO J.* 16,1413-1426.
- Wills, K. N., Atencio, I. A., Avanzini, J. B., Neuteboom, S., Phelan, A., Philopena, J., Sutjipto, S., Vaillancourt, M. T., Wen, S. F., Ralston, R. O., Johnson, D. E. (2001). Intratumoral spread and increased efficacy of a p53-VP22 fusion protein expressed by a recombinant adenovirus. *J. Virol.* 75, 8733-8741.
- Wybranietz, W. A., Prinz, F., Spiegel, M., Schenk, A., Bitzer, M., Gregor, M., Lauer, U. M. (1999). Quantification of VP22-GFP spread by direct fluorescence in 15 commonly used cell lines. *J. Gene Med.* 1, 265-274.
- Wybranietz, W. A., Groß, C. D., Phelan, A., O'Hare, P., Spiegel, M., Graepler, F., Bitzer, M., Stähler, P., Gregor, M., Lauer, U. M. (2001). Enhanced suicide gene effect by adenoviral transduction of a VP22-cytosine deaminase (CD) fusion gene. *Gene Ther.* 8, 1654-1664.
- Xia, H., Mao, Q., Davidson, B. L. (2001). The HIV TAT protein transduction domain improves the biodistribution of glucuronidase expressed from recombinant viral vectors. *Nat. Biotechnol.* 19, 640-644.
- Yamamoto, Y., Gaynor, R. B. (2001). Role of the NF- κ B pathway in the pathogenesis of human disease states. *Curr. Mol. Med.* 1, 287-296.
- Yamamoto, Y., Kim, D. W., Kwak, Y. T., Prajapati, S., Verma, U., Gaynor, R. B. (2001). IKK γ /NEMO facilitates the recruitment of the I κ B proteins into the I κ B kinase complex. *J. Biol. Chem.* 276, 36327-36336.
- Yamaoka, S., Courtois, G., Bessia, C., Whiteside, S. C., Weil, R., Agou, F., Kirk, H. E., Kay, R. J., Israel, A. (1998). Complementation cloning of NEMO, a component of the I κ B kinase complex essential for NF- κ B activation. *Cell* 93, 1231-1240.
- Yaron, A., Hatzubai, A., Davis, M., Lavon, I., Amit, S., Manning, A. M., Andersen, J. S., Mann, M., Mercurio, F., Ben-Neriah, Y. (1998). Identification of the receptor component of the I κ B α -ubiquitin ligase. *Nature* 396, 590-594.
- Yin, M. J., Yamamoto, Y., Gaynor, R. B. (1998). The anti-inflammatory agents aspirin and salicylate inhibit the activity of I κ B kinase- β . *Nature* 396, 77-80.
- Yoon, H. Y., Lee, S. H., Cho, S. W., Lee, J. E., Yoon, C. S., Park, J., Kim, T. U., Choi, S. Y. (2002). TAT-mediated delivery of human glutamate dehydrogenase into PC12 cells. *Neurochem. Int.* 41, 27-42.
- Zabel, U., Baeuerle, P. A. (1990). Purified human I κ B can rapidly dissociate the complex of the NF- κ B transcription factor with its cognate DNA. *Cell* 61, 255-265.

Zandi, E., Rothwarf, D. M., Delhase, M., Hayakawa, M., Karin, M. (1997). The I κ B kinase complex (IKK) contains two kinase subunits, IKK α and IKK β , necessary for I κ B phosphorylation and NF- κ B activation. *Cell* 91, 243-252.

Zandi, E., Chen, Y., Karin, M. (1998). Direct phosphorylation of I κ B by IKK α and IKK β : discrimination between free and NF- κ B bound substrate. *Science* 281, 1360-1363.

Zhong, H., Voll, R. E., Ghosh, S. (1998). Phosphorylation of NF- κ B p65 by PKA stimulates transcriptional activity by promoting a novel bivalent interaction with the coactivator CBP/p300. *Mol. Cell* 1, 661-671.

Zhou, G., Kuo, M. T. (1997). NF- κ B-mediated induction of mdr1b expression by insulin in rat hepatoma cells. *J. Biol. Chem.* 272, 15174-15183.

Eigene Publikationen:

Stroh, C., Schulze-Osthoff, K. (1998). Death by a thousand cuts: an ever increasing list of caspase substrates. *Cell Death Diff.* 6, 997-1000.

Ferrari, D., Stroh, C., Schulze-Osthoff, K. (1999). P2X7/P2Z purinoreceptor-mediated activation of transcription factor NFAT in microglial cells. *J. Biol. Chem.* 274, 13205-13210.

Stroh, C., Wybranietz, W., Schulze-Osthoff, K. (1999). Novel approach in the treatment of inflammatory diseases: Inhibition of NF- κ B through intracellular delivery of I κ B α by HSV-1 structural protein VP22. *Immunobiology* 200, 593-594.

Engels, I. H., Stepczynska, A., Stroh, C., Lauber, K., Berg, C., Schwenzer, R., Wajant, H., Jänicke, R. U., Porter, A. G., Belka, C., Gregor, M., Schulze-Osthoff, K., Wesselborg, S. (2000). Caspase-8/FLICE functions as an executioner caspase in anticancer drug-induced apoptosis. *Oncogene* 19, 4563-4573.

Schulze-Osthoff, K., Stroh, C. (2000). Induced proximity model attracts NF- κ B researchers. *Cell Death Diff.* 7, 1025-1026.

Los, M., Stroh, C., Jänicke, R., U., Engels, I. H., Schulze-Osthoff, K. (2001). Caspases: more than just killers? *Trends Immunol.* 22, 31-34.

Michalke, M., Stroh, C., Chlichlia, K., Stepczynska, A., Mozoluk, M., Los, M. (2001). The emerging role of caspases in signal transduction as revealed by knock-out studies - not only apoptosis. *Signal Transd.* 2, 51-65.

Engels, I. H., Mozoluk, M., Stroh, C., Schulze-Osthoff, K. (2001). Apoptosis triggered by death receptors. In: Ebadi, M., Marwah, J., Chopra, R. K., (Eds.). *Mitochondrial Ubiquinone (Coenzyme Q10): Biochemical, Functional, Medical, and Therapeutical Aspects in Human Health and Diseases*. Prominent Press.

Shpacovitch, V. M., Brzoska, T., Buddenkotte, J., Stroh, C., Sommerhoff, C. P., Ansel, J. C., Schulze-Osthoff, K., Bunnett, N. W., Luger, T. A., Steinhoff, M. (2002). Agonists of proteinase-activated receptor 2 induce cytokine release and activation of nuclear factor κ B in human dermal microvascular endothelial cells. *J. Invest. Dermatol.* 118, 380-285.

Los, M., Mozoluk, M., Ferrari, D., Stepczynska, A., Stroh, C., Renz, A., Herceg, Z., Wang, Z. Q., Schulze-Osthoff, K. (2002). Activation and Caspase-mediated Inhibition of PARP: A Molecular Switch between Fibroblast Necrosis and Apoptosis in Death Receptor Signaling. *Mol. Biol. Cell* 13, 978-988.

Stroh, C., Cassens, U., Samraj, A. K., Sibrowski, W., Schulze-Osthoff, K., Los, M. (2002). The role of caspases in cryoinjury: caspase inhibition strongly improves the recovery of cryopreserved hematopoietic and other cells. *FASEB J.*, akzeptiert am 12.06.2002.

Stroh, C., Schulze-Osthoff, K.

Intracellular delivery of I κ B α by HSV-1 structural protein VP22: Employment of a new protein transduction system to inhibit the transcription factor NF- κ B. Manuskript in Vorbereitung.

Verzeichnis der akademischen Lehrer

Meine akademischen Lehrer waren die Damen und Herren:

Anatomie:	Reutter
Anorganische Biochemie:	Hartmann, Weser
Anorganische Chemie:	Lindner, Strähle
Biochemie:	Bisswanger, Bohley, Eisele, Fröhlich, Gebhardt, Griffith (Chapel Hill), Hamprecht, Mecke, Probst, Sancar (Chapel Hill), Van Dyke (Chapel Hill), Wiesinger
Botanik:	Metzner, Wegmann,
Immunologie:	Clarke, Cohen, Klapper (alle Chapel Hill), Rammensee
Mathematik:	Pommer
Mikrobiologie:	Braun, Götz
Organische Chemie:	Albert, Bayer, Hagenmeier, Hanack, Jung, Stegmann
Pharmakologie/Toxikologie:	Bock, Breyer-Pfaff, Pfaff, Schwarz, Werringloer
Physik:	Nakel, Staudt
Physikalische Biochemie:	Voelter
Physikalische Chemie:	Hoffmann, Gauglitz, Oberhammer, Oelkrug
Zoologie:	Günzl, Pfeiffer

ohne Ortsangabe: Tübingen

Lebenslauf Christopher Stroh

- 26.09.1971 geboren in Wiesbaden
- 1977-1981 Besuch der Grundschule in Hachenburg, Westerwald
1981-1990 Besuch des Priv. Gymnasiums der Zisterzienserabtei Marienstatt mit dem Abschluss der Allgemeinen Hochschulreife
- 1990-1991 Wehrdienst in der 4. Kompanie/Panzerbataillon 151 in Westerburg
- 1991-1998 Studium der Biochemie
an der Eberhard-Karls-Universität Tübingen
- 10/1992 1. Teil der Vorprüfung zur Diplomprüfung
in Physiologischer Chemie und Biochemie
- 04/1994 2. Teil der Vorprüfung zur Diplomprüfung
in Physiologischer Chemie und Biochemie
- 1994-1995 Studium der Biochemie
an der University of North Carolina in Chapel Hill
- 06-07/1995 Praktikum bei der Firma E. Merck, Darmstadt
- 08/1997-03/1998 Diplomarbeit bei Herrn Prof. Dr. Michael Schwarz über das Thema:
„Die Rolle des Transkriptionsfaktors NF- κ B bei der Vermittlung des Apoptoseschutzes durch Tumorpromotoren und andere Apoptose-inhibierende Substanzen“
am Toxikologischen Institut der Universität Tübingen
- 03/1998 Diplom in Physiologischer Chemie und Biochemie
- 1998-2002 Dissertation bei Herrn Prof. Dr. Klaus Schulze-Osthoff über das Thema:
„Entwicklung neuer Proteintransduktionssysteme zur Hemmung des Transkriptionsfaktors NF- κ B“
- 05/1998-07/1999 an der Universitätsklinik Tübingen, Abteilung Innere Medizin I
08/1999-05/2002 am Institut für Experimentelle Dermatologie,
Abteilung für Immunologie und Zellbiologie
der Westfälischen Wilhelms-Universität Münster

